

(Aus der Kinderklinik der Universität Basel
[Vorsteher: Professor Dr. E. Freudenberg.])

Zur Frage
der Wirkung des Kathepsins und Pepsins
des menschlichen Magensaftes
auf feste Substrate

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Georg Springer

von Heidelberg

1951.

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag
von Prof. Dr. E. Freudenberg

Tag der Promotion: 8. Juni 1961

Sonderdruck aus „Biochemische Zeitschrift“,
Band 321, Heft 2, S. 107—141



Zur Frage der Wirkung des Kathepsins und Pepsins des menschlichen Magensaftes auf feste Substrate.

Von

GEORG F. SPRINGER.

Aus der Kinderklinik der Universität Basel
(Vorsteher: Prof. Dr. E. FREUDENBERG).

Mit 18 Textabbildungen.

(Eingegangen am 31. März 1950.)

1. Geschichtliches.

Das Pepsin wurde von SCHWANN vor über 100 Jahren entdeckt und galt bis 1940 als die einzig wirksame Proteinase des Magensaftes.

WILLSTÄTTER berichtet als Erster über Kathepsin im menschlichen Magen, führt dessen Vorkommen aber zurück auf die Leukocyten in der Magenwand und eine gelegentliche Auswanderung derselben in das Magenlumen. Er hält die Menge im Magensaft jedoch für zu gering, als daß sie für eine Verdauung in Frage käme.

Tatsächlich beträgt die Leukocytenemigration nach Untersuchungen von JASSINOWSKI zur Zeit der sogenannten Verdauungsleukocytose nur 0,1 Zellen pro cm^2 und min. (Im Vergleich hierzu beträgt die Emigration im oberen Duodenum 2,1 Zellen pro cm^2 min.) Bei diesen Emigrationen handelt es sich überwiegend um Lymphocyten, deren Kathepsingehalt nahezu null ist.

Nach Auffassung der genannten und aller folgenden Autoren ist Kathepsin an die Struktur der Zelle gebunden und wird nicht sezerniert.

Die Forschung der letzten Jahre hat ergeben, daß das Kathepsin — abgesehen von seinem Vorkommen in verschiedenen Organen — nicht wie WILLSTÄTTER und BAMANN meinten, eine einheitliche Substanz ist. M. BERGMANN z. B. unterscheidet nicht weniger als 4 Kathepsine entsprechend ihrer Substratspezifität, Aktivierbarkeit usw. (es handelt sich hier auch keineswegs *nur* um Proteinase noch *nur* um Peptidasen). Hiervon hat Kathepsin I am meisten Ähnlichkeit mit den Eigenschaften des Pepsins. Abweichend hiervon sind Befunde von ANSON, SCHÄFFNER und TRUELLE, LANG und WEGNER. Einigkeit besteht nur insofern, als das ursprüngliche Kathepsin als Komplex verschiedener Komponenten aufgefaßt werden muß, die aber nicht stets alle gemeinsam aufzutreten brauchen.

In seiner Dissertation, die im Jahre 1940 unter der Leitung von E. FREUDENBERG im Basler Kinderspital entstand, berichtet S. BUCHS

erstmalig über die erhebliche Wirkung eines weiteren — neben dem Pepsin — eiweißspaltenden Enzyms im menschlichen Magensaft. Danach ist es gelungen, zumindest auf Grund chemischer und physikalischer Eigenschaften wie: p_H -Optimum, Temperaturoptimum und Aktivierbarkeit durch HCN , H_2S , größerer Resistenz gewissen Energieformen des elektromagnetischen Spektrums gegenüber im Verhältnis zum Pepsin, dasselbe vom Pepsin zu sondern und als ein in die Gruppe der Kathepsine WILLSTÄTTERS gehöriges Ferment einzuordnen.

Eine völlige Trennung der Kathepsinwirkung von derjenigen des Pepsins gelang jedoch bisher nicht, auch die Stellung zum Labvorgang wurde nicht restlos abgeklärt. — Es gelang im Basler Kinderspital, dessen Befunde mehrfach (z. B. von MERTEN u. Mitarb.) bestätigt wurden, das Magenkathepsin bei fast allen Tieren, jedenfalls dort, wo auch das Pepsin eine Rolle spielt, nachzuweisen. — Das Kathepsin darf als das phylogenetisch ältere, an seiner Bedeutung in aufsteigender Entwicklungsreihe jedoch nichts einbüßende Enzym angesehen werden¹.

FREUDENBERG und BUCHS kommen auf Grund der angeführten Versuche zu folgender Anschauung über die Verdauung im menschlichen Magen: Es findet unter physiologischen Bedingungen eine Eiweißspaltung im Magen unter allen Umständen statt, selbst wenn eine Reaktion herrscht, bei der eine Pepsinwirkung nach den Untersuchungen von SOERENSEN, L. MICHAELIS sowie vielen Befunden von NORTHROP, nicht anzunehmen ist.

Das Kathepsin mit seinem Optimum zwischen p_H 3—4 tritt in die Lücke, die zwischen dem Pepsinoptimum (p_H 1,5—2) im Magen und dem des Trypsins (p_H 7—8) im Dünndarm klafft, wobei man sich Pepsin, Kathepsin und Lab nicht als drei völlig voneinander unabhängige Komponenten vorzustellen hat. Vielmehr wird angenommen, daß es sich um eine einheitliche Grundsubstanz handelt, deren Wirken bei p_H 6 als Parachymosin, bei 4—3 als Kathepsin und zwischen 2—1 als Pepsin imponiere. In diese Richtung weisen unter vielen anderen auch die Befunde von TISELIUS.

In diese Lücke also, die zwischen der maximalen Pepsinwirkung einerseits und der des Trypsins andererseits besteht, die physiologisch aber gerade wichtig ist, da in ihr während der längsten Zeit der Magenverdauung das Reaktionsmilieu des Speisebreies sich befindet, tritt nun das Kathepsin. — Der Magen muß, bevor ein Optimum für die Pepsinwirkung erreicht wird, Salzsäure in großer Menge absondern, die zunächst abgepuffert wird. In dieser Zeit aber wird ein großer Teil des angedauten, pufferfähigen Materials in das Duodenum abgeschoben, erst spät — frühestens nach etwa 2 Std — wird ein p_H von 1,8—2,2 erreicht, bei dem

¹ Ausführliches über diese Probleme findet sich in der Monographie von S. BUCHS „Über die Biologie des Magenkathepsins“, Basel 1947.

allein das Pepsin auf die noch vorhandene Eiweißmenge, die nicht in das Duodenum transportiert und auch nicht vom Kathepsin, in dessen Wirkungsoptimum sich das p_H während der längsten Zeit befand, verdaut wurde, einwirken kann. Der Magen ist dann aber bereits am Ende seiner physiologischen Verdauungstätigkeit angelangt und nahezu leer.

Die Resultate der Untersuchungen von FREUDENBERG und BUCHS beziehen sich auf magengesunde Individuen. — Eine Komplizierung erfahren nach diesen Autoren die Verhältnisse dadurch, daß auch unter physiologischen Bedingungen bisweilen während der Verdauung Duodenalsaft in den Magen zurückfließt, der die aktuelle Reaktion gegen p_H 6 zurückdrängt und ebenfalls eiweißverdauendes Trypsin mitbringt.

Durch die Untersuchungen von BUCHS wurde auch die Ursache des langen Übersehens des Kathepsineffektes im Magen geklärt. Dies rührt daher, daß zumeist mit käuflichen Pepsinpräparaten, nicht aber mit Magensäften gearbeitet wurde. Bei der Gewinnung von Magenschleimhautextrakten kommt es aber auf die Art der Extraktion an, nur in stark saurem Milieu wird auch Kathepsin aus der Magenschleimhaut gelöst. Geschieht die Extraktion alkalisch, neutral, schwach sauer oder mit Glycerin, so werden nur kleinste Mengen Kathepsin erhalten, auch spätere Ansäuerung bleibt hier ohne Wirkung. (Eine der üblichsten Methoden zur Pepsindarstellung ist z. B. die Extraktion mit Glycerin nach v. WITTICH, auch von L. MICHAELIS 1910 empfohlen.) Angaben über die Verdauungsverhältnisse der Magenprotease sind also nur bei genauer Auskunft über die Art ihrer Gewinnung von Wert.

2. Fragestellung.

Die im vorigen Kapitel angedeutete Anschauung über den Ablauf der Verdauung im Magen hat als Grundlage Versuchsanordnungen, die vorwiegend den Charakter enzymchemischer Modellversuche zeigen. Meine Aufgabe war die: unter Bedingungen zu arbeiten, die denen einer ungehinderten Verdauung in natura reichlich vorkommender Eiweißkörper durch den menschlichen Magen möglichst nahe kommen und festzustellen, welche Bedeutung hier das Magenkathepsin habe.

Es wurden daher keine hochgereinigten Ausgangssubstanzen — Fermente und Substrate — verwandt. Da in der menschlichen Nahrung festes Eiweiß in denaturierter Form die Hauptrolle spielt, sollte gerade dieses studiert werden.

Im Laufe der Untersuchungen ergaben sich weitere Fragestellungen, die ebenfalls kurz abgehandelt werden.

3. Darstellung der Ausgangsmaterialien.

a) Gewinnung der Fermente.

Magensaft älterer, normacider, magengesunder Rekonvaleszentenkin- der des Basler Kinderspitals wurde verwendet. Dieser wurde gewonnen durch Gabe eines EWALD-BOASSchen Probefrühstücks auf nüchternen Magen. Nach etwa 30 min

erfolgte Ausheberung des Magens, im Durchschnitt erhielt man etwa 80 cm³ mit Schleim vermischten Magensaft. Nur Kongo +-Ausheberungen wurden aufgearbeitet. Es folgte Filterung durch grobes Papierfilter oder Glaswolle zur Befreiung von Schleimpartikeln und Speiseresten, dann wurden zur Haltbarmachung zu je 3 Magensäften 1—2 Thymolkristalle zugegeben und der Saft im Eisschrank aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen bleibt der aktive Enzymgehalt des Magens auch bei monatelanger Aufbewahrung nahezu konstant (BUCHS). Unmittelbar vor dem Ansetzen eines Versuches wurde der benötigten Menge Magensaft Calciumcarbonat im Überschuß zugesetzt und so auf ein p_H von etwa 5,5 abgestumpft. So erhielt man ein konstantes p_H für die zugesetzte Fermentmenge und vermied eine unvorhersehbare Belastung der Pufferlösungen. — Es wurden stets drei Magenausheberungen gemischt, um etwaige Ungleichmäßigkeiten des Fermentgehaltes zu vermeiden.

Tabelle 1.

Eiweiß von:		Gesamt-N nach KJELDAHL %	Gesamt-N × 6,25 %	Asche %	
a	1. Fibrin	14,55	90,94	—	} tierisch
	2. Paracasein (Kuhmilch) . . .	15,00	93,75	5,8%	
b	1. Eialbumin	15,05	94,06	1,9%	
	2. Fischmuskel (Gadus morrhua)	13,97	87,31	1,0%	
	3. Hühnermuskel	16,30	101,88	—	
	4. Rindsmuskel	15,91	99,44	—	
	5. Kalbsleber	13,02	81,38	1,4%	
	6. Kollagen (Nackenband, Rind)	15,88	99,25	0,2%	
	7. Parmesankäse	13,42	83,88	6,6%	
c	1. Bohnen getrocknet	14,75	91,89	1,6%	} pflanzlich
	2. Erbsen getrocknet	13,23	82,68	3,9%	
	3. Hafer getrocknet	11,67	72,96	—	
	4. Soja getrocknet und entölt .	17,21	107,56	1,2%	

b) Gewinnung der Substrate.

Um von allen wichtigen Nahrungsproteinen wenigstens eine Gruppe zu erfassen, wurden 13 verschiedene Eiweißkörper verwandt. Diese lassen sich der Herkunft und den Methoden der Darstellung nach in 3 Gruppen einteilen:

Zu a 1: Insgesamt 15 l *Ochsenblut* wurden mit Na-Oxalat ungerinnbar gemacht und zentrifugiert, bis sich das Plasma leicht abheben ließ. In diesem wurde dann durch Zusatz der notwendigen in aq. dest. gelösten Menge CaCl₂ und etwas Thrombin das Fibrinogen in Fibrin umgewandelt; dasselbe gründlich mit aq. dest. gewaschen, abgenutscht, anschließend in kleine Mullbeutelchen gepackt und dann für 20 min zur Denaturierung und Zerstörung etwa vorhandener Enzyme in kochendes Wasser gebracht. — Es folgte Zerkleinerung und Trocknung des Fibrins in einer aufsteigenden Reihe von: je 2 mal 80% Aceton, 2 mal 100% Aceton und 2 mal Äther; in jeder dieser Flüssigkeiten wurde die Substanz etwa 12 Std belassen und so auch weitgehend von anhaftenden Farbstoffen befreit. Endlich erfolgte Trocknung in einem Exsiccator und Vermahlen zu Pulver in einem Mörser.

Zu a 2: Frische, *rohe Milch* wurde durch Zentrifugieren entfettet, auf 38° erwärmt und dann pro 100 cm³ 1 g käufliches reines Kälberlab zugesetzt, nachdem zuvor mittels 1 n Essigsäure (5 cm³ auf 250 cm³ Milch) ein p_H von 5,7—5,9 eingestellt wurde. Es wurde gut durchmischt. Als bald schied sich Paracasein am

Boden ab und retrahierte sich. Durch Auspressen erfolgte völlige Befreiung von der Molke. Die anschließende Weiterbehandlung erfolgte wie unter a 1. — Die im Folgenden besprochenen Darstellungsmethoden werden nur soweit geschildert, bis eine Aufarbeitung entsprechend dem Abnutschen mit Waschung durch aq. dest. und eine Weiterbehandlung wie unter a 1 beginnt.

Zu b 1: *Eieralbumin*: käufliches, reinstes, fand Verwendung und wurde 25 min gekocht.

Zu b 2—5: *Fisch-, Hühner- und Rindsmuskel* wurden gleich behandelt. Stets fand nur fettarmes Fleisch Verwendung. Dieses wurde zerkleinert, durch 20minütiges Kochen im 5fachen Volumen aq. dest. denaturiert und dann auf die alte Weise fertig präpariert. *Kalbsleber* wurde, nach vorheriger langer Extraktion mit Äther, auf die gleiche Weise aufgearbeitet.

Zu b 6: *Kollagen*: 600 g Nackenband und Sehne eines frischgeschlachteten Rindes wurden fein gehackt, mit 2 l 1% iger NaHCO_3 -Lösung versetzt auf pH von 7—8 gebracht, 10 g Trypsin reinst zugesetzt und dann 36 Std bei Zimmertemperatur unter zeitweiligem Umrühren stehengelassen. So wurden alle anderen Eiweißkörper wie Mucin, Elastin usw. weggedaut und ein reines Kollagenpräparat erhalten. Es folgte gründliches Abnutschen mit Waschung durch aq. dest. und dann 2stündige Erwärmung auf 65° in einem Liter 96% igem Alkohol zur Denaturierung und Zerstörung anhaftender Fermente. Anschließend wurden mit dem Rasiermesser die saubersten Stücke herausgeschnitten, fein gemahlen und wie üblich getrocknet.

Zu b 7: *Parmesankäse* (Gruppe der Cheddarkäse): Es wurde etwa 5 Jahre alter fein gemahlen und das Fett gründlich durch Äther extrahiert, anschließend das Eiweiß denaturiert und getrocknet.

Zu c: Anders, unter sich aber nach den gleichen Prinzipien wurden die pflanzlichen Proteine der Soja, Buschbohnen, Hafer und gelben Erbsen gewonnen. Es wurden je 500 g der betreffenden Substanz fein gemahlen, entfettet und mit dem 10fachen Volumen einer n/30 bis n/40 NaOH versetzt, so daß stets ein pH zwischen 11—12 bestand. Dieses Gemisch wurde in einem großen Glasbottich unter zeitweiligem Umrühren bei Zimmertemperatur 12—16 Std belassen. Die überstehende Flüssigkeit wurde alsdann vom Satz gesondert, 20 min lang bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. In der so gewonnenen Flüssigkeit wurde empirisch das Flockungsoptimum im isoelektrischen Bereiche festgestellt. Zum Ausflocken wurde stets Milchsäure verwendet. Es wurden gebraucht:

für Erbseneiweiß 10 cm³ 93% ige Milchsäure pro Liter eiweißhaltiger Flüssigkeit

Bohneneiweiß 5 cm³ 93% ige „ „ „ „

Sojaeiweiß 5 cm³ 93% ige „ „ „ „

Hafer eiweiß 2,5 cm³ 93% ige „ „ „ „

Der Hafer setzte der Isolierung des Eiweißes große Schwierigkeiten entgegen, es entstand eine stark fadenziehende schleimige Flüssigkeit, die zur endgültigen Sedimentierung noch des Zusatzes der zweifachen Menge 100% igen Acetons bedurfte. — Der Gesamt-Stickstoff (N) wurde nach der Eiweißveraschungsmethode von KJELDAHL bestimmt. Siehe Tab. 1. — Bestimmung der Aschen nach STOLTE.

c) Herstellung der Puffer und Lösungen.

Zunächst wurden HCl-Lösungen n/2, n/10 und n/15 für den Bereich von pH 0,8—2,4 verwendet, an die sich für alkalischere Bereiche Essigsäurelösungen und Acetatpuffer anschlossen (von pH 2,5—6). Es war das Bestreben, Abstände zu erhalten, deren Differenz nicht mehr als 0,3 pH betrug.

Im Laufe der Arbeit erwies es sich jedoch als zweckmäßig, für jede Versuchsserie durch die ganze pH-Skala das gleiche Lösungsmittel zu verwenden, da der Einfluß der angewandten Säure auf die Verdauung, wie später gezeigt wird, nicht ohne Belang ist und mit der Dissoziationskonstanten der Säuren variiert.

Hergestellt wurden aus der jeweils konzentriertesten Lösung Verdünnungen unter Titration und anschließender Messung mit der Glaselektrode¹:

1. HCl-Lösungen
2. Essigsäurelösungen und Acetatpuffer
3. Phosphorsäurelösungen (H_3PO_4) und Phosphatpuffer
4. Citronensäurepuffer (Herstellung Im Citronensäure titriert mit Phenolphthalein als Indikator, m/5 Na_2HPO_4 titriert mit Methylorange)
5. Milchsäure (die Milchsäure wurde hydrolysiert und zwar 1200 cm³ 90% iger käuflicher Ms mit 800 cm³ aq. dest. 50 min gekocht).

4. Versuchstechnik.

Das Prinzip der Versuchsanordnung war stets das gleiche. Es wurden H^+ -Aktivitätskurven der Eiweißverdauung durch die Fermente aufgenommen und graphisch dargestellt (Ordinate = mg des Verdauten, Abscisse = negativer log. der H^+ -Konzentration). Es wurden Umsätze gleicher Zeiten gewertet und verglichen. Gemessen wurde der Substratschwund. Dieser Weg erscheint richtig, da ein Ferment nach dem Substrat, welches es abbaut, benannt wird, nicht aber nach den Spaltprodukten, die durch seine Tätigkeit entstehen.

In eine Serie von je 50 cm³ fassende ERLÉNMEYER-Kölbchen mit gleichem Bodendurchmesser wurden je 250 mg der zu untersuchenden Substanz eingewogen, anschließend pro Kölbchen 9 cm³ der gewünschten Säure- oder Pufferlösung eingefüllt und die Serie in einen Brutofen (40° C) gestellt. Neben der eigentlichen Versuchsreihe lief stets eine als Leerversuch parallel unter den gleichen Bedingungen, aber ohne Zusatz von Enzym. Die hier durch Säureeinwirkung erzielte Substratverminderung wurde bei Auswertung stets in Abzug gebracht. Nach 12 Std Verweildauer im Brutofen, während denen eine ausreichende Quellung des Substrates sowie eine Einstellung des pH erfolgen konnte, wurde in die eigentliche Versuchsserie pro Gläschen 1 cm³ des wie oben angegeben präparierten Magensaftes zugefügt. Nun erfolgte die eigentliche Verdauung wieder bei 40° C und der gewünschten Zeit. Kleinere Abweichungen von dieser Anordnung, wie sie sich aus der Eigenart des Substrates oder dem erwünschten Einfluß der Umgebung ergaben, werden bei den einzelnen Versuchen besonders vermerkt werden.

Nach Abschluß der Verdauung wurde der Inhalt jeden Gläschens durch ein eigenes Filter gegossen², welches im Exsiccator getrocknet und vorgewogen war, die Flüssigkeit im Reagenzglas aufzufangen, und das Kölbchen solange mit derselben gespült, bis dasselbe frei von Substrat war, und dieses sich quantitativ auf dem Filter befand. Die Durchführung fand bei Zimmertemperatur statt. Zuweilen, besonders bei stärkerer Substratquellung, und mäßig starker Verdauung nahm der Filtervorgang lange Zeit in Anspruch, dann wurde im Eisschrank filtriert, um etwaige weitere Fermenteinwirkung zu verhüten. Das pH des Inhaltes jedes einzelnen Kölbchens wurde anschließend — also nach dem Versuch — mit der Glaselektrode gemessen. Die Filter selbst wurden nun zunächst mit je etwa 75 cm³ aq. dest. überspült und im Anschluß daran jedes mit 25 cm³ 100% Aceton entwässert.

¹ Alle pH-Werte dieser Arbeit wurden mit der Glaselektrode Tena-M.R. 104 der AG. für Meßapparate in Bern erhalten.

² Ungehärtetes Filtrierpapier der Firma Schleicher-Schuell No. 5891 $\varnothing$ 7 cm; Asche per Filter > 30 γ .

Zum Abschluß wurde 3—5 Tage im Exsiccator getrocknet und erneut gewogen. Die Eigengewichte der Filter sowie die Leerwerte, die der Substratlöslichkeit in sauren Lösungen entsprachen, kamen in Abzug. Aus dem noch verbleibenden Gewichte der Substanzen erfolgte die Berechnung der Menge des Verdauten, welche Werte dann wie oben angegeben, eingetragen wurden (bei den Versuchen, bei denen Salz- oder Zuckerlösungen zugegeben wurden, erfolgte eine Spülung mit je 500 cm³ aq. dest. an Stelle der 75 cm³, die sonst benötigt wurden). Alle Proteine zeigten in einem Gebiet, saurer als pH 2, eine dunkle, ins rote spielende Farbe. Bei sorgfältiger Kontrolle der Methode ergaben sich im Endresultat Abweichungen die $\pm 2\%$ nie überschritten.

5a. Die Abhängigkeit der Fermenteinwirkung vom Charakter des Substrates.

Betrachtet man die Umsatzkurven verschiedener Substrate aber gleichartiger Säurelösungen in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration und der Zeit, so lassen sich deutliche Unterschiede feststellen (wie z. B. Abb. 1 zeigt), die bei Konstanz der Umsatzgrößen gleicher Substrate und aller äußeren Bedingungen nur in den Substraten selbst liegen können.

Vergleichen wir tierische und pflanzliche Eiweiße, so fällt auf, daß bei tierischem Protein die Umsätze bei pH 1,8 etwa gleich hoch sind wie bei pH 3,0. Unter Berücksichtigung der oben dargelegten Vorstellungen von FREUDENBERG und BUCHS bedeutet dies, daß der Kathepsineffekt für tierische Eiweiße in diesem pH-Bereiche, unter gleichen äußeren Bedingungen, ebenso groß ist, wie der des Pepsins. Beim pflanzlichen Eiweiß sind die Umsätze bei pH 3 geringer und betragen 80—50% des Pepsinoptimums. Tab. 2 zeigt anschaulich die geschilderten Verhältnisse. Die Werte von pH 1,8 und 3,0 als Stichpunkte mögen willkürlich erscheinen, da sie nicht stets genau mit den theoretisch zu fordernden

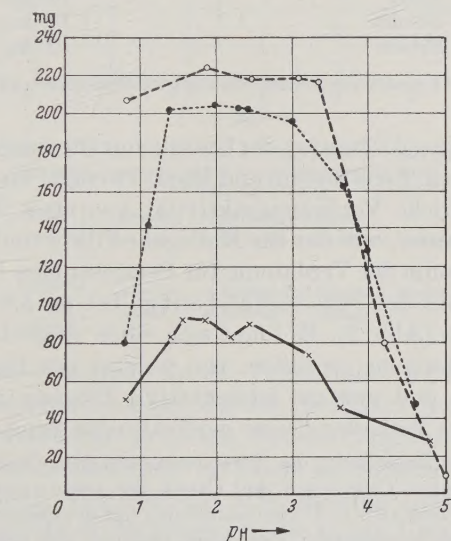


Abb. 1.

- ×— = 48 Std Vorquellen, 12 Std Verdauen von Kollagen
 - - - = 12 Std Vorquellen, 12 Std Verdauen von Fibrin
 - - -○- - - = 12 Std Vorquellen, 48 Std Verdauen von Kollagen
- je 250 mg in Salzsäure.

Optima zusammenfallen. Um eine Übersicht zu gewinnen, ergeben sie jedoch brauchbare Anhaltspunkte.

Tabelle 2.

Eiweiß gewonnen aus:	Umsatz bei pH 1,8 = 100 %	Umsatz bei pH 3,0 = % des Umsatzes bei pH 1,80
Fibrin	222 mg	217 mg = 98 %
Hühnermuskel	216 mg	218 mg = 101 %
Rindermuskel	204 mg	198 mg = 96 %
Fischmuskel	229 mg	217 mg = 95 %
Parmesan	149 mg	142 mg = 95 %
Paracasein	158 mg	160 mg = 101 %
Kalbsleber	140 mg	106 mg = 75,5 %
Rindskollagen	204 mg	198 mg = 96 %
Eieralbumin	200 mg	186 mg = 93 %
Soja	143 mg	126 mg = 81 %
Hafer	139 mg	70 mg = 50,5 %
Bohnen	129 mg	65 mg = 50,5 %
Erbsen	120 mg	80 mg = 66,6 %

Die Umsätze beziehen sich auf gleiche Zeiten und gleiche äußere Bedingungen.

Bei pH 4,0 beträgt der Umsatz nur für einige wenige Eiweißkörper, z. B. Bohnen, Eieralbumin und Muskel weniger als 10%. Meistens besteht noch erhebliche Verdauungsaktivität von etwa 25% und mehr des Pepsinoptimums, wie das für Kollagen, Fibrin und Erbsen der Fall ist, ja das Optimum der Verdauung für Parmesankäse liegt bei pH 4,4 (Abb. 2); der Umsatz des Paracaseins beträgt bei pH 5,0 noch 75% des Pepsinoptimums (Abb. 2). Es lohnt sich einen Augenblick bei der letzt erwähnten Substanz zu verweilen, von welcher der Parmesankäse nur eine durch Alter und gewisse fermentative Prozesse geänderte Variante ist, für dessen Verhalten grosso modo also das gleiche gilt.

Zur Entstehung des Paracaseins aus dem Casein durch Einwirkung des Labfermentes (Caseinogen und Casein der anglo-amerikanischen Literatur) schreibt z. B. LEHNARTZ in Übereinstimmung mit der gesamten Weltliteratur: „Das“ durch Labung entstehende „Paracasein vereinigt sich mit den Calciumionen der Milch zu einem unlöslichen Salz und fällt als Gerinnsel aus“. Die Untersuchungen ergaben jedoch, daß das Ca-Paracaseingerinnsel durch den Labungsvorgang (durchgeführt wie in Abschnitt 3b angegeben) keineswegs unlöslich niedergeschlagen wird, auch dann nicht, wenn man zu der Milch vorher CaCl_2 im Überschuß zugibt. Nimmt man das Gerinnsel nach der Retraktion aus der Molke und bringt es in aq. dest. oder in Lösungen verschiedenen Säuregrades, gleich welcher Natur, so zeigt sich das Paracasein lediglich im stark sauren Bereich unter 1,5 als schwer löslich. In der isoelektrischen Zone ist es unlöslich, beiderseits derselben aber steigt die Löslichkeit rapid bis auf 100% an und erreicht ihr Maximum zwischen pH 2,5 und 3,5 sowie pH 5,3—7,5. Dieser Prozeß vollzieht sich in recht kurzer Zeit und wird auch durch gründliches Denaturieren (vermittels halbstündigen Kochens) nicht geändert. Auch erneute Labung hat nur einen unvollständigen Effekt. Eine augen-

blickliche Ausflockung dieses gelösten Paracaseins kann man jedoch erzielen durch Zugabe von Ca-Ionen. Durch Zugabe von CaCl_2 zum Lösungsmittel läßt sich eine Lösung des Paracaseins von vornherein vermeiden.

Die übliche Versuchsanordnung wurde für diese beiden Substrate dahingehend geändert, daß an Stelle von 9 cm³ Säurelösung pro Glas nur 8,5 cm³ derselben verwendet und je 0,5 cm³ einer 10%igen CaCl_2 -Lösung zugefügt wurde. Die Substrate verhielten sich dann wie die anderen Eiweißkörper.

Wie bereits erwähnt beträgt der Umsatz des Paracaseins bei pH 5,0 noch 75% des Pepsinoptimums. Dieses im Vergleich zu anderen Proteinen eigentümliche Verhalten des Substrates Paracasein, nämlich seine Verdaubarkeit bis etwa pH 6,0, das aus dem wichtigsten Eiweiß der Milch entsteht, scheint insofern von Bedeutung, als gerade bei jüngeren Säuglingen, deren Magenacidität in den ersten 2 Std pH 4,0 sozusagen nie unterschreitet (FREUDENBERG), Milch das Hauptnahrungsmittel darstellt. Es handelt sich also um eine optimale „An-

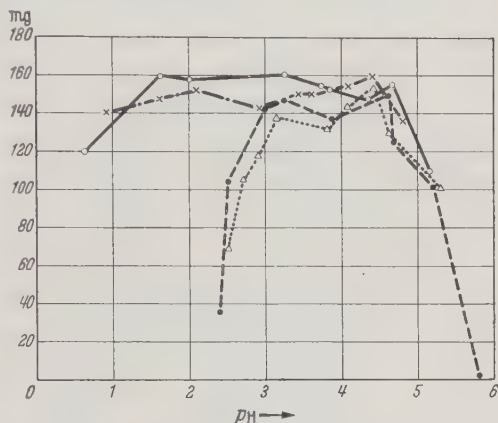


Abb. 2. 12 Std Vorquellen, 48 Std Verdauen von je 250 mg Substanz, versetzt mit 8,5 cm³ Säurelösung und 0,5 cm³ 10% Cl_2 -Lösung,

Para- { —○— = Salzsäure-Lösung,
casein { - - - x - = Essigsäure-Lösung u. Acetatpuffer

Parme- { - · - · - Δ - = Essigsäure-Lösung u. Acetatpuffer
san- { - · - · - x - = Salzsäure-Lösung.
eiweiß

passung“ der Enzym-Substratverbindung an die Verhältnisse der Umgebung und die physiologischen Forderungen, die der kindliche Organismus stellen muß, um seinen Eiweißbedarf zu decken. Daß die Ursache für so hohe Umsätze in diesen Reaktionsbereichen vor allem im Substrat begründet sein muß, ist aus einem Vergleich mit allen anderen Umsatzkurven dieser Arbeit klar ersichtlich. Es beruhen diese hohen Umsätze entweder auf Kathepsin- oder Chymosinwirkung, da der Grad und die Art des Eiweißabbaues mit der angewandten Methode nicht feststellbar ist. Ebenfalls im Gegensatz zu allen anderen Umsatzkurven verlaufen die des Paracaseins und Parmesans plateauartig auf etwa gleichem Niveau zwischen 1,5 und 4,75, während z. B. Erbseneiweiß einen neuen Umsatzgipfel zwischen pH 4,25 und 5,0 zeigt, nachdem von 1,5 ein langsam konstantes Absinken bis gegen pH 4,0 festzustellen ist (Abb. 3). Es ist bemerkenswert, daß gerade beim Legumin der Erbse, bei Fisch-, Rind- und Hühnermuskel sowie der Leber und dem Hafer (Abb. 3, 4, 5, 10, 16) im Bereich zwischen 4,5 und 5,5 erneut höhere Umsätze auftreten, handelt es

sich hier doch vorwiegend um Substrate, für die bereits HAMMARSTEN eine Spaltung durch das lebende Chymosin in Erwägung zog. Es ist nicht erforderlich, hier mit HAMMARSTEN die Tätigkeit eines vom Pepsin-Kathepsinkomplex ganz verschiedenen Enzyms anzunehmen. Vielmehr kann man diese Wirksamkeit den verschiedenen Einflüssen des Reaktionsmediums zuschreiben (V. DAM). Freilich, diese Fähigkeit der Magenprotease kommt nicht bei allen Substraten zur Geltung. — Diese Befunde sind eine

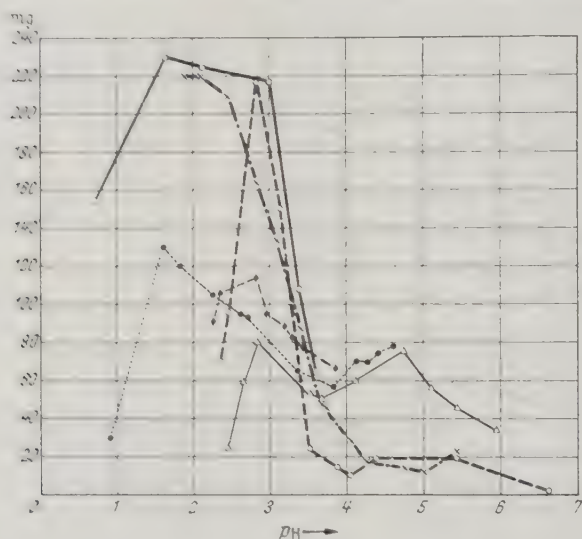


Abb. 3. Je 12 Std Vorquellen.

a) 48 Std Verdauen von je 250 mg denaturiertem Erbseneiweiß.

b) 24 Std Verdauen von je 250 mg denaturiertem Fischeiweiß.

●—● = Salzsäurelösungen,
 ○—○ = Essigsäurelösungen u. Acetatpuffer,
 ◊—◊ = Milchsäurelösungen.

○—○ = Salzsäurelösungen,
 x—x = Zitronensäurepuffer,
 ◊—◊ = Essigsäurelösungen u. Acetatpuffer.

weitere Stütze der Auffassung, daß es sich bei der Magenprotease um einen einheitlichen Grundkörper handelt, der je nach dem speziellen Milieu und Substrat entsprechende Funktionen annimmt. Bis jetzt wurde noch nie ein Unterschied im Grade des Eiweißabbaues durch Pepsin — Kathepsin — Chymosin festgestellt.

Kollagen und Fibrin zeigen ein wieder anderes Verhalten, sie haben nur einen Gipfel und recht symmetrisch verlaufende Umsatzkurven. Bei pH 4.25 wird immer noch viel verdaut, etwa 25% des Pepsinoptimums (Abb. 1). Unsymmetrischer aber mit etwa gleich hohem Umsatz bei pH 4.25 ist die Verdauungskurve für Sojaeiweiß (Abb. 5).

Hirgegen beträgt für Eieralbumin und Bohneneiweiß der Umsatz bei pH 4.0 höchstens noch 5% des Optimums und steigt in alkalischeren Bereichen nicht mehr an (Abb. 6).

Es lassen sich nach den Umsatzkurven unter gleichen Ferment-, Zeit- und Milieubedingungen die Eiweiße in 4 Gruppen teilen: Solche, die wie

Paracasein plateaumäßig gleich hohe Umsätze zwischen 1,5 und 5,0, solche, die wie das Legumin der Erbse einen maximalen Umsatz bei 1,5 zeigen, um dann langsam weniger verdaut zu werden, bis ein neuer mittelgroßer Anstieg zwischen 4,5 und 5,5 eintritt. Ein Beispiel einer dritten Möglichkeit stellt das Fibrin dar, welches ein breites Optimum zwischen p_H 1,5 und 3,5 besitzt, das nach beiden Seiten hin langsam abfällt. Das Eieralbumin dient als Paradigma für eine vierte Gruppe.

Auch hier erstreckt sich das Verdauungsoptimum über 2 p_H -Bereiche, nach beiden Seiten erfolgt aber ein Abfall.

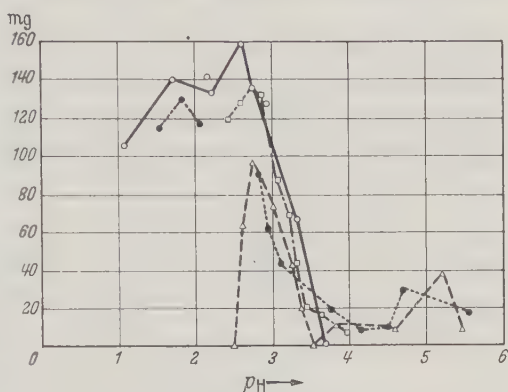


Abb. 4. 12 Std Vorquellen, 48 Std Verdauen, von je 250 mg denaturiertem Lebereiweiß,

- — ○ = Salzsäurelösungen,
- — — = Phosphorsäurelösungen,
- △ — △ = Essigsäurelösungen,
- — □ = Milchsäurelösungen.

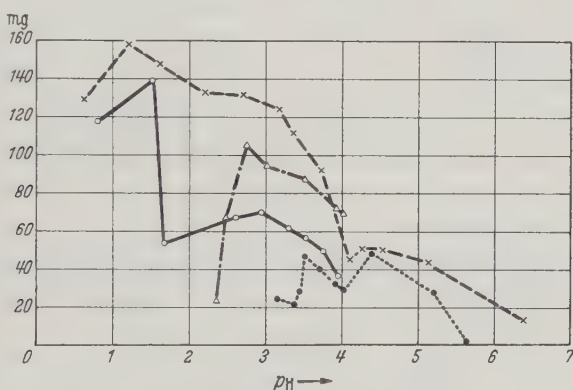


Abb. 5. Je 12 Std Vorquellen.

a) 48 Std Verdauen von je 250 mg Hafeiweiß denaturiert:

b) 24 Std Verdauen von je 250 mg Sojaweiß denaturiert.

- — ○ = Salzsäurelösungen,
- △ — △ = Essigsäurelösungen u. Acetatpuffer.

- x — x = Salzsäurelösungen,
- — □ = Essigsäurelösungen u. Acetatpuffer.

Es wird aus diesen Ergebnissen ersichtlich, welch großen Einfluß die Substrate auf die Verdauung ausüben. Ihrem Charakter kommt eine

ebensolche Bedeutung zu, wie dem der Enzyme. Da auf dem linken, sauren Schenkel der Kurven die größte Einheitlichkeit herrscht, so kann

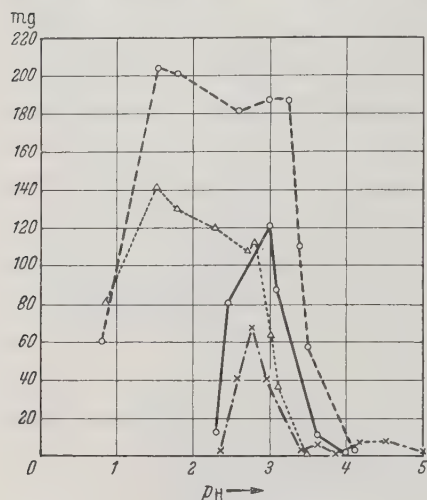


Abb. 6. Je 12 Std Vorquellen,

a) 36 Std Verdauen von je 250 mg denaturiertem Eialbumin,

--- = HCl-Lösungen,
— = Essigsäurelösungen.

b) 48 Std Verdauen von je 250 mg denaturiertem Bohneneiweiß.

△-----△ = Salzsäurelösungen,
x-----x = Essigsäurelösungen und Acetatpuffer.

Daß die Substrate in bedeutendem Ausmaße die Fermente adsorbieren, geht aus Abb. 7 hervor. Eine Deutung dieses wichtigen Phänomens wird später zu geben versucht.

Daß das Kathepsinoptimum in Abb. 7a nur $\frac{2}{3}$ des Pepsinoptimums beträgt, beruht auf Schädigung durch Aceton- und Ätherbehandlung, wie schon BUCHS feststellte.

Tabelle 3.

	Fibrin	Paracasein	Eialbumin	Muskeleiweiß
I. E. P.	6,4	4,6	4,84—4,90	5,2—6,0
Optimaler Umsatz .	1,5—3,4	1,5—4,7	1,5 —3,25	1,5—3,25

Die in der Literatur angegebenen I. E. P. haben für die hier angewandten nicht hochgereinigten Proteine nur beschränkte Gültigkeit. Für unsere Belange ist dies aber unwesentlich, da nur gezeigt werden soll, daß Magensaftkathepsin in seiner Wirksamkeit nicht eingestellt ist auf den I. E. P., sondern der optimale Umsatz fast immer in erheblich saureren Bereichen stattfindet.

man sagen, daß das Optimum des Abbaues durch den katheptischen Anteil der Protease mit dem Substrat variiert, und daß bis zu einem gewissen Punkte, auf den im Abschnitt 5h noch eingegangen wird, die Umsätze um so mehr ansteigen, je weiter sich das Eiweiß von seinem I. E. P. entfernt. Betrachtet man die isoelektrischen Punkte der verwendeten Substrate mit den Gipfeln ihrer Umsätze, so muß man feststellen, daß hier keine direkten Beziehungen zu bestehen scheinen, wofür die folgende Tab. 3 ein Beispiel gibt.

Das Optimum der Umsätze liegt im sauren Bereich für alle Proteine zwischen 1,25 und 1,8 meistens bei etwa 1,5. Wird das p_H saurer als 1,0, so erfolgt ein recht steiler Abfall (welcher, wie später gezeigt wird, nicht nur p_H -abhängig ist).

In Abb. 7 stellt der Umsatz des Paracaseins zudem eine Stütze der unitarischen Auffassung des Lab- und Verdauungsvorganges dar, zu der sich schon PAWLOW bekannte. Auch stimmt sie überein mit der FREUDENBERG-BUCHSSchen Anschauung der Magenprotease als *eines* Komplexenzymes. Wie die Legende besagt, wurde die Kurve erhalten durch Zusatz reinen Kälberlabes zu roher Milch, und dann ohne weiteren Fermentzusatz das so gewonnene Paracasein unter variiertem p_H sich

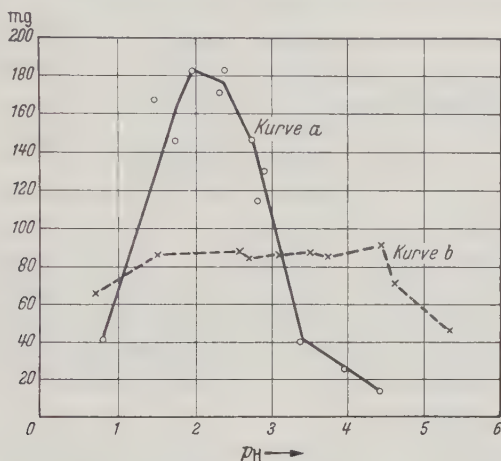


Abb. 7. a) 6 Std im Eisschrank Vorquellen, 36 Std Verdauen bei 40° C von je 250 mg Eialbumin in HCl. Es wurden 10 g denaturiertes Eialbumin vorher mit 100 cm³ Kongo + Magensaft versetzt, in den Eisschrank (+ 2° C) gestellt und im Abstand von etwa 2 Std geschüttelt. Nach 15 Std herausgenommen, abgepreßt, in Aceton-Äther, Äther und im Exsiccator getrocknet. Weitere Enzyme wurden nicht mehr zugesetzt. o—o = Kurve a. b) Durch Zugabe von 5 g reinem Kälberlab wurde aus 750 g entrahmter, mit in Essigsäure auf p_H 5,7 gebrachter, roher Milch Paracasein durch Labung gewonnen. Dasselbe wurde nach Trocknung wie in a in je 8,5 cm³ Salzsäure oder Acetatpuffern + je 0,5 cm³ 10% $CaCl_2$ 38 Std im Brutschrank bei 40° sich selbst überlassen. Kein weiterer Zusatz von Enzymen. ×---× = Kurve b.

selbst überlassen (Leerwertbestimmung wie üblich). Es besteht *völlige* qualitative Identität des Kurvenverlaufes mit demjenigen der Abb. 2, die durch Zusatz menschlichen Magensaftes zu denaturiertem und von etwa anhaftendem Ferment befreitem Paracasein erhalten wurde. Eine stärkere Stütze der beiden oben vorgebrachten Ansichten erscheint kaum denkbar. — Paracasein läßt sich auch gut durch menschlichen Magensaft bei p_H 6,0 gewinnen und zeigt dann bei gleicher Weiterbehandlung dieselben Verhältnisse wie sie hier für das Kalbslab ausgeführt wurden.

Die Oberfläche der Substrate ist nicht ohne Bedeutung für die Umsatzgröße innerhalb der Zeiteinheit. Ein Teil des so außerordentlich verschiedenen Verhaltens von Fibrin und Paracasein dürfte darauf zurückzuführen sein. Erstere Substanz läßt sich zu einem feinen Pulver zer mahlen, während Paracasein äußerst hart ist und so in etwas größeren

Partikeln Verwendung fand. Die Bedeutung der Quellung für die Verdauung dürfte nur eine indirekte sein: Vergrößerung der Oberfläche. Das geht auch daraus hervor, daß Milch- und Essigsäure, die im allgemeinen am stärksten von allen angewandten Säuren quellend wirken, nie die höchsten Umsätze ergaben und im Bereiche der stärksten Quellung sogar ausgesprochen hemmten. Ein Vergleich des Zeitumsatzes von Fibrin und Kollagen (Abb. 1) zeigt jedoch, daß die Oberflächengröße nicht allein entscheidend ist für die Angreifbarkeit eines Eiweißes, da beide Proteine pro Gewichtseinheit etwa die gleiche Oberfläche besitzen. *Die Fähigkeit der Magenprotease, die Moleküle des jeweiligen Substrates aufzubrechen, wird mitbestimmt von dem angegriffenen Protein selbst.*

5b. Einfluß der Zeit.

Wie bereits erwähnt, wurden stets Umsätze gleicher Zeiten verglichen. Folgende Fragen erheben sich hier:

1. Welche Bedeutung hat der Zeitfaktor im allgemeinen und
2. Welcher Art sind die Unterschiede in seinem Verhalten gegenüber den verschiedenen geprüften Substraten und Fermentanteilen?
3. Stehen Fermentkonzentrationen und Umsatzgrad in der Zeiteinheit — bei gleicher Proteinmenge — in einem Verhältnis, etwa umgekehrt proportional zueinander?
4. Ist bei konstantem Enzymgehalt die Menge des in gegebener Zeit gespaltenen Substrates direkt proportional der Substratkonzentration?

Nachdem sich das p_H im Verlaufe der Quellungen eingestellt hatte, traten, sobald die Verdauung in Gang gesetzt wurde, Verschiebungen desselben auf und zwar ausnahmslos nach der alkalischen Seite. Diese Verschiebungen sind sehr geringfügig und nach 30—40 min beendet, am stärksten sind sie bei den am wenigsten gepufferten Säurelösungen, immer

Tabelle 4.

	Umsatz bei		Umsatz- quotient p_H 0,75 1,80	Umsatz bei		Umsatz- quotient p_H 3,75 3,00
	p_H 0,75	p_H 1,80		p_H 3,75	p_H 3,00	
<i>Fibrin</i>						
3 Std verdaut	61 mg	186 mg	0,33	18 mg	120 mg	0,15
12 Std verdaut	206 mg	222 mg	0,93	155 mg	215 mg	0,71
<i>Rindmuskel</i>						
9 Std verdaut	60 mg	180 mg	0,33	20 mg	100 mg	0,20
24 Std verdaut	158 mg	204 mg	0,77	64 mg	196 mg	0,33
<i>Fischmuskel</i>						
4 Std verdaut	56 mg	167 mg	0,33	2 mg	40 mg	0,05
24 Std verdaut	175 mg	228 mg	0,77	48 mg	217 mg	0,22

Die Angaben beziehen sich auf Temperaturen von 40° C und HCl-Lösungen (siehe Abb.: 3, 8, 10, 12b).

kleiner als 0,2 p_H . Bei Temperaturerhöhung erfolgt die Einstellung erheblich rascher. Diese Befunde stimmen überein mit Erfahrungen von SOERENSEN und NORTHROP (die Messungen der Wasserstoffionenkonzentration wurden stets *nach* der Verdauung angestellt).

Mit zunehmender Dauer der Versuche findet eine relativ stärkere Erhöhung der Umsätze in den peripheren Teilen der Kurve gegenüber dem mittleren an sich optimalen p_H -Bereiche statt. Zur Veranschaulichung seien hier die Werte für Fibrin, Rind- und Fischmuskel angeführt (Tab. 4).

Das Verhalten des Gesamtumsatzes in Abhängigkeit von der Zeit geben Abb. 1 für Kollagen und 8 für Fibrin wieder. Mit längerer Dauer der Fermenteinwirkung verschiebt sich das Optimum des peptischen Anteiles immer mehr in das saure Gebiet, was auch schon SOERENSEN feststellte. Mit den katheptischen Werten verhält es sich ähnlich, wenn man den Wirkungsbereich zwischen 3,00 und 3,75 vergleicht; einzig Paracasein und Kollagen zeigen diese Erscheinung wenig deutlich (Abb. 1). Erklärbar ist dies durch die lange Anlaufzeit, die erforderlich ist, bis überhaupt größere Umsätze erzielt werden. — Aus der Symmetrie der Kurvenverlaufsform

lassen sich Schlüsse kaum ziehen, da dieselbe in logarithmischer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration steht. — Die katheptische Komponente ergreift mit Verlängerung der Dauer der Wirksamkeit immer weniger saure Bereiche; ihre optimalen Angriffsmöglichkeiten ergeben sich erst bei fortschreitender Verdauung, also *nicht* von Anbeginn an. Der Effekt im katheptischen Schenkel ist ungleichmäßiger und stärker substratbedingt als im Pepsinbereich, wo es zu einer nahezu gesetzmäßig konstanten Relation zwischen den beiden tabellarisch (Tab. 4) argeführten p_H -Werten kommt. Abb. 9 gibt den Ablauf der Fibrinverdauung bei p_H 1,5 und 3,25 wieder. Man erkennt deutlich, daß der peptische Anteil sich sehr rasch einem Maximum nähert, um diesem dann asymptotisch zuzustreben, während der kathep-

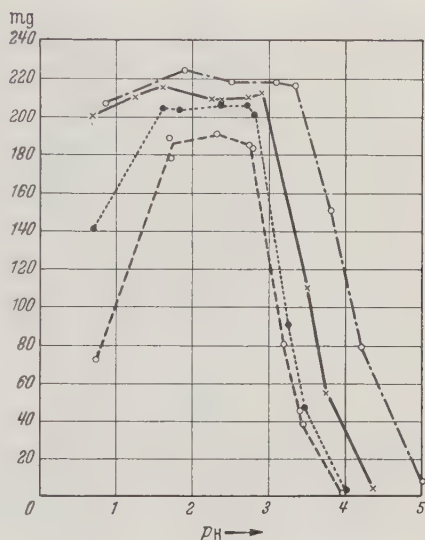


Abb. 8. 12 Std Vorquellen von je 250 mg denaturiertem Ochsenblutfibrin in Salzsäurelösung.

24 Std Verdauen } = ———
 12 Std Verdauen } = - - - - -
 6 Std Verdauen } = x x x x x
 4 Std Verdauen } =
 3 Std Verdauen } = ———

tische Anteil zwar im Prinzip das gleiche Verhalten darbietet, aber gerade die doppelte Zeit hierzu benötigt. Nach $4\frac{1}{2}$ Std ist die Differenz am größten. Der peptische Umsatz ist dann 2 mal so groß wie der katheptische.

Es ergibt sich also bei Vergleich der Umsätze unter identischem p_H bei differenter Zeit, daß dieselben im stark sauren und schwach sauren Bereich relativ zunehmen gegenüber relativer Abnahme in den mittleren

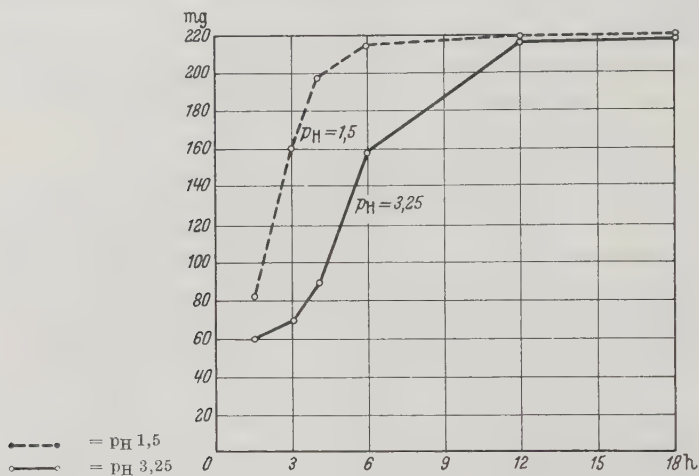


Abb. 9. Umsätze von je 250 mg Fibrin unter gleichen Bedingungen in HCl-Lösungen in Abhängigkeit von der Zeit.

Bereichen (Abb. 8, 10 u. a.). Dies läßt sich erklären, entweder durch Auftreten von Hemmstoffen als Produkten der Enzym-Substratwirkung oder aber durch Einstellung eines Gleichgewichtes der verschiedenen miteinander reagierenden und entstehenden Körper.

Ein Grund, daß die Umsätze der Menge des zugesetzten Substrates nie gleich sind, liegt im Abzug derjenigen Mengen, die durch Säure allein aufgelöst werden. Diese sind substratabhängig, bei anorganischen Säuren erreichen diese Werte nur bei hohen Säurekonzentrationen in Ausnahmefällen mehr als 10%, während dies bei den organischen Säuren häufiger zutrifft. In einem breiten Bereich um den I. E. P. ist die Säurelöslichkeit zumeist äußerst gering. < 5% zwischen p_H 2,2—5,5.

Betrachtet man das Verhältnis der Umsatzgrößen zum Zeitfaktor bei den einzelnen Proteinen, so ergibt sich bei konstanten Ferment- und Substratmengen das schon im vorigen Abschnitt gezeichnete Bild. Die langsame Angreifbarkeit pflanzlicher Proteine ist um so bemerkenswerter, als der Gesamt-N-Gehalt dieser Substanzen keineswegs große Differenzen gegenüber tierischen Eiweißen aufweist (Tab. 1). Beträgt er doch für Bohnen 14,75 und Fibrin 14,55 — beide sind feingepulverte Substanzen

von annähernd gleicher Teilchengröße und Oberfläche. — Der Umsatz des Fibrins ist aber in der Hälfte der Zeit etwa doppelt so groß und in $\frac{1}{16}$ der Zeit immer noch größer als der des Bohneneiweißes bei gleichem pH (Abb. 8 u. 6).

Wie aus einem Blick auf Abb. 11 erhellt, ist die zur Spaltung einer gegebenen Substanzmenge (Substrat: Kollagen) notwendige Zeit im allgemeinen nicht umgekehrt proportional der Fermentkonzentration. An-

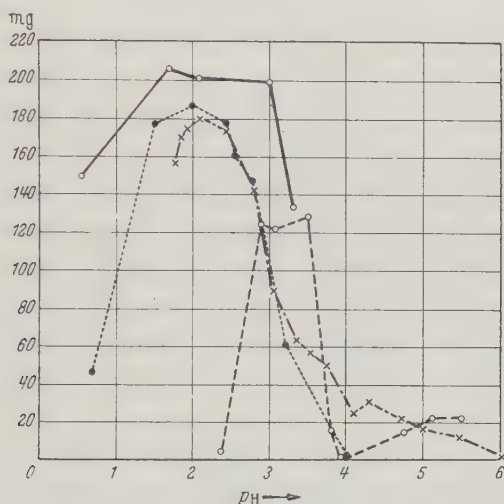


Abb. 10. 12 Std Vorquellen, 24 Std Verdauen von je 250 mg denaturiertem Rindsmuskel.

- | | | | |
|----------------------------------|------------------------|-------|---------------------------|
| —○— | = HCl-Lösungen, | | = 27 Std Vorquellen, |
| - - -○- | = Essigsäurelösungen, | | = 9 Std Verdauen in Salz- |
| ×- - -× | = Zitronensäurepuffer. | | säurelösungen. |
| (Magensaft eines anderen Datums) | | | |

nähernd trifft dieser für eine ideale, monomolekulare katalytische Reaktion zu fordernde Sachverhalt nur zu im Bereiche zwischen 0,75—1,5. Im weiteren Kurvenverlaufe ist jedoch zu konstatieren, daß bei halber Enzymkonzentration und doppelter Einwirkungszeit die Umsätze bis zu 25% höher sind als diejenigen bei doppelter Enzymkonzentration und halber Einwirkungszeit. — Auch ist die in der Zeiteinheit gespaltene Proteinmenge nicht direkt proportional der Substratkonzentration. Immerhin ist hier ein regelmäßigeres Verhalten festzustellen, indem bei doppelter Substratmenge meist, in den optimalen Bereichen, gegenüber den Umsätzen bei halber Ausgangskonzentration 150% der Substrate gespalten werden. Bei großen Substratmengen wird in der Zeiteinheit und bei konstantem Fermentgehalt ein geringerer prozentualer Anteil umgesetzt; der Grad der Verdauung wächst viel langsamer als die Konzentration des Substrates. („Sättigung“ des Enzyms mit Substrat

NORTHROP.) Bemerkenswert ist, daß bei halber Verdauungszeit und halber Substratkonzentration die Umsätze in den optimalen Bezirken annähernd halb so groß sind wie die bei doppelter Verdauungszeit und doppelter Substratkonzentration mit jedoch identischem Fermentgehalt.

Nach dieser Anordnung ist zu erwarten, daß die größten Umsätze beim höchsten Fermentgehalt auftreten. Nur verläuft die Umsatzsteigerung, wie die Versuche ergaben, nicht proportional der zugesetzten Ferment-

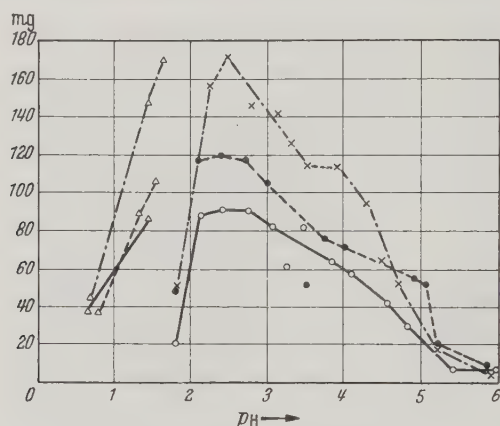


Abb. 11. 12 Std Vorquellen,

- = je 250 mg mit 2,00 cm³ Magensaft 20 Std verdaut
- - - = je 250 mg mit 1,00 cm³ Magensaft 40 Std verdaut
- · - = je 500 mg mit 1,00 cm³ Magensaft 40 Std verdaut

- △ △ △ △ = HCl-Lösungen
- x x x o = Zitronensäure und Zitratpuffer

Substrat: denaturiertes Kollagen. Enzym: stets vom gleichen Magensaft.

menge, sie ist vielmehr erheblich kleiner; im Bereiche der hohen Verdauungswerte läßt sich ein Verhalten im Sinne der SCHÜTZschen Regel feststellen. — Daß die Übereinstimmung mit theoretisch zu fordernden Werten keine ideale ist, liegt wahrscheinlich in den wenig gereinigten Ausgangsprodukten. Diese Verhältnisse gelten gleichmäßig für den katheptischen und peptischen Anteil der Magenprotease.

5c. Bedeutung der Temperatur.

Nur der Einfluß erhöhter Temperaturen wurde untersucht. Niedrigere zeigen lediglich Änderungen im Sinne der Regel VAN t'HOFFS (BUCHS). Bei erhöhten Temperaturen gilt diese Regel für Enzyme ebenfalls, es läuft aber der Prozeß der Hitzezerstörung, der individuell verschieden ist, der R. G. T.-Regel entgegen.

Es war das Bestreben, durch Temperaturverschiebung in den Bereich des von BUCHS beschriebenen Temperaturoptimums für Kathepsin zu

gelangen und so den katheptischen Anteil der Magenprotease bei gleichzeitiger Hemmung des peptischen Teiles möglichst isoliert zu zeigen. Diesem Unterfangen stellten sich folgende Schwierigkeiten entgegen:

1. Es ließen sich nicht alle Substrate verwenden, da ein Teil von ihnen, vor allem mit organischen Säuren, so stark quoll, daß er zur Gallerte erstarrte, während anderes Substrat sich völlig verflüssigte. Auch hier äußerten die Eiweißkörper ihren verschiedenen Charakter, denn mehrere Proteine änderten sich unter dem Temperatureinfluß nicht sichtbar.

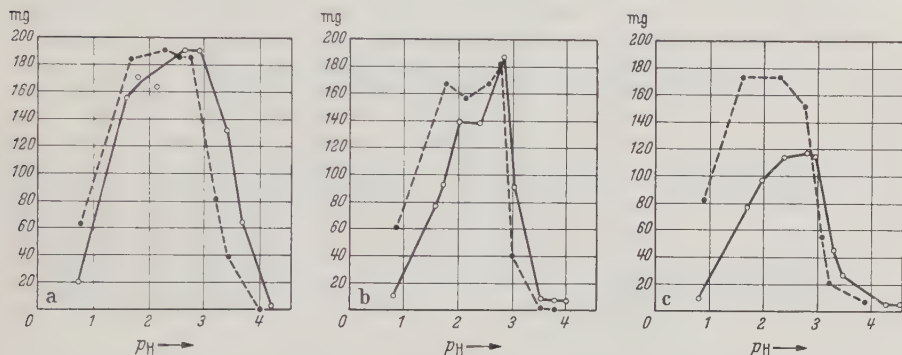


Abb. 12a. Zuerst 8 Std Vorquellen bei 38°, dann 1 Std Vorquellen bei 73° C, hierauf 3 Std Verdauen bei 73° C = $\circ\text{---}\circ$. Kontrollserie mit gleichem Magensaft 39 Std. Vorquellen bei 38° C. 3 Std Verdauen = $\bullet\text{---}\bullet$ bei 38° C in HCl-Lösungen. Substrat: Fibrin.

Abb. 12b. 4 stündige Verdauung von je 250 mg denaturiertem Fischeiweiß. Gleiche Dauer der Vorquellung wie in Kurve 12 a. $\circ\text{---}\circ$ = Verdauung bei 73° C, $\bullet\text{---}\bullet$ = Verdauung bei 38° C in HCl-Lösungen.

Abb. 12c. 5 stündige Verdauung von je 250 mg denaturiertem Rindsmuskel in HCl-Lösungen. Vorquellen wie in Abb. 12 a. 73° C = $\circ\text{---}\circ$, 38° C = $\bullet\text{---}\bullet$.

2. Zeitlich lange Hitzeeinwirkung schädigte die gesamte Magenprotease sowohl im katheptischen wie im peptischen Anteil. Bei Erhöhung der Temperatur nur bis auf das von BUCHS angegebene Kathepsinoptimum von etwa 63° trat die erwähnte Adsorption des Fermentes an das Substrat störend in Erscheinung, indem auch der peptische Anteil vor der für ihn schädlichen Hitze weitgehend geschützt wurde. —

Es galt also eine Zeit zu finden, die lang genug war, das Ferment zur Einwirkung kommen zu lassen, ohne bereits das Kathepsin zu schädigen und eine Temperatur zu wählen, die eine Aktivierung des vermuteten katheptischen Anteiles deutlich machte.

Das Resultat dieser Bemühungen stellen die Abb. 12a—12c dar. Die Versuchsanordnung geht aus der den Abb. beigefügten Legende hervor. Ein Vergleich derselben zeigt deutlich, daß mit zunehmender Exponierungszeit eine immer stärkere Hemmung des Umsatzes im stark sauren, später auch im schwach sauren Bereiche auftritt. In allen 3 Abb. zeigt

sich aber auch bei 73° eine deutliche Verschiebung des Verdauungs-optimums gegen p_H 3,0 hin.

Erhitzt man den Magensaft ohne Zusatz von Substrat auf etwa 65° und verdaut dann das Protein bei 40°, so findet man diese Umsatzsteigerung nicht.

Während man in Abb. 12a, die die kürzeste Exponierungszeit von 3 Std hat, eine deutliche Aktivierung des schwach sauren und ebenfalls signifikante Hemmung des stark sauren Schenkels feststellen kann, zeigt Abb. 12b bei 4stündiger Verdauung eine ausgesprochene Hemmung im sauren Bereich; um p_H 3,0 kann man eine Schädigung noch nicht erkennen. Verdauungen, die 4 Std überschreiten, schädigen auch die Kathepsinkomponente, jedoch in weit geringerem Ausmaße, so daß ein deutliches Optimum um p_H 3,0 resultiert, wie folgende Tab. 5 zeigt:

Tabelle 5.

pH	1,00	1,50	1,75	2,00	2,25	2,50	2,75	3,00	3,25	3,50	4,00
73°	12%	53,4	68,5	84,5	93,5	100	100	93,1	43,1	21,6	8,6%
40°	56%	92	100	100	100	93	87	40	11,5	8,7	0%

Vergleich der Umsätze bei 73° C und 40° C von 5stündig verdaulichem Rinder-muskeleiweiß in HCl-Reihen; ausgedrückt in % des optimalen Umsatzes jeder einzelnen Serie (siehe Abb. 12c).

Wir können dieses Temperaturverhalten bei allen Substraten konstatieren, wenn wir den Zeitfaktor geeignet wählen. Diese Befunde lassen sich in Einklang bringen mit den Ergebnissen von BUCHS an flüssigen Substraten.

5 d. Einfluß von Aktivatoren und Hemmstoffen.

Die von FREUDENBERG und BUCHS angegebene Aktivierbarkeit des Magensaftkathepsins durch verschiedene Sulfhydrylgruppen und noch stärker durch Blausäure konnten MERTEN u. Mitarb. bei ihren Untersuchungen nicht bestätigen. Die eigenen Versuche, die an verschiedenen Substraten durchgeführt wurden, ergaben ebenfalls in keinem Falle eine Aktivierung eines Fermentes oder einer Fermentkomponente. Es waren vielmehr die Umsätze mit und ohne H_2S -Zugabe stets identisch.

(Versuchsanordnung: 5stündiges Durchströmen des mit $CaCO_3$ abgestumpften Magensaftes mit Schwefelwasserstoff und 20minütiges Durchperlen jedes einzelnen Kölbchens, in dem sich nur die Lösung befand, und in das anschließend das Substrat gegeben wurde, worauf mit Gummistopfen luftdichter Abschluß erfolgte.)

Auch Versuche mit Cysteinhydrochlorid im Verhältnis 1:2,5 (Cysteinhydrochlorid: Substrat) zeigten in HCl-Lösungen bei mehreren Substraten im Vergleich mit Umsätzen ohne Cystein völlige Identität der Umsätze bei gleichem p_H . Es sei jedoch ein bemerkenswertes nur einmal erzielt Resultat hier wiedergegeben (Abb. 13a). Bei Betrachtung dieser Kurve ergibt sich zwischen p_H 3,0 bis

5,5tatsächlich eine Umsatzsteigerung bei den mit Cystein versetzten Substraten von etwa 30% gegenüber unbeeinflusster Verdauung der gleichen Substanz mit dem gleichen Magensaft. Vergleicht man dieses Resultat durch Cysteinaktivierung mit Abb. 2, bei der im gleichen Arbeitsvorgang gewonnenes Paracasein Verwendung fand, nur der Magensaft ein anderer war, so ergibt sich Identität beider Kurven. Hiernach scheint es unter Voraussetzung einer Kathepsinwirkung, daß der katheptische Magensaft, wenn er nicht voll aktiviert vorliegt, was jedoch nur in Ausnahmefällen

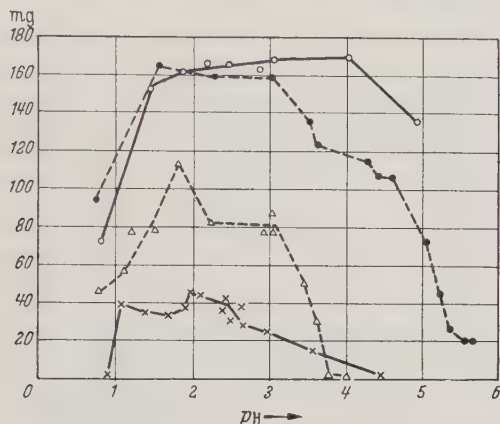


Abb. 13. a) 8 Std Vorquellen, 48 Std Verdauen von Paracasein in je 8,5 cm³ HCl + 0,5 cm³ 10% CaCl₂

—○— = mit Zugabe von 100 mg Cysteinhydrochlorid pro Kölbchen,
 - - -○- - = ohne Zugaben.

b) 12 Std Vorquellen, 90 min Verdauen von je 250 mg denaturiertem Ochsenblutfibrin in HCl-Lösungen bei 38° C.

—△—△— ohne Zusatz,
 —×—×— = + je 1 cm³ 10% HCN (siehe Text).

vorkommen dürfte, durch Redoxpotentiale in vollaktiven Zustand gebracht werden kann.

Wie verhält es sich nun mit der Beeinflussung der Magenprotease durch Blausäure?

Als Substrat fand hier Fibrin Verwendung. In einer Vielzahl von Versuchen wurde nie eine Aktivierung sondern stets eine sehr ausgesprochene Hemmung gefunden, die im peptischen Anteil eher stärker war (Abb. 13).

(Versuchsanordnung: Wie üblich, außerdem zu einer Serie je 1 cm³ 10% HCN, gewonnen aus KCN + aq. dest., freigesetzt mit HCl, mit der titriert wurde bis zum Umschlagpunkt von Methylorange; pH 3,0; 1 cm³ KCN verbraucht 12,5 cm³ n/10 HCl; pro cm³ KCN wurden daher 0,625 cm³ 2 n HCl verwendet. Das entstehende KCl ist so niedrig konzentriert, daß sein Einfluß vernachlässigt werden kann.)

Eine Deutung der Befunde fällt schwer solange man über die Struktur der Magenprotease nichts weiß. („Vergiftung“ des Substrates oder Schädigung des Fermentes analog der schwermetallhaltigen Enzyme?)

5e. Verhalten gegenüber Ascaridenextrakt.

1903 zeigte WEINLAND, daß Ascaridenextrakte sowohl antipeptische als auch antitryptische Wirkung besitzen. Dahingegen lösen sie sich unter der Einwirkung von Papain rasch und leicht auf. Es war daher reizvoll, den Einfluß eines Ascaridenextraktes (nach den Angaben von ABELIN hergestellt) gegenüber Magenkathepsin zu beobachten. (Freundlicherweise von Dr. BUCHS mit seiner Schnellmethode an Edestin untersucht.) Sie ergab eine gleichmäßig — sehr stark — hemmende Wirkung des Extraktes in allen p_H -Bereichen.

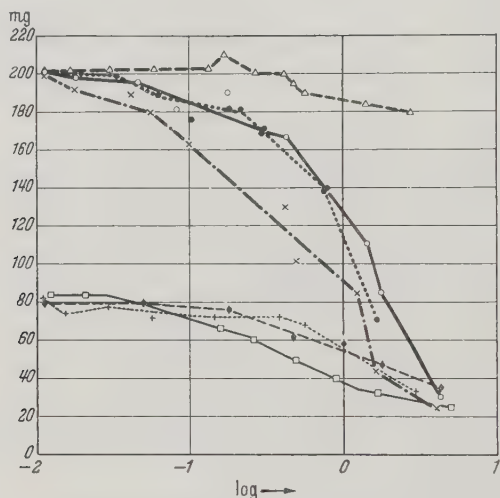


Abb. 14.

p_H -Schwankungen		Zufügung von:	
n/15 HCl	2,00 — 1,94	—△—△—	= Glukose ($C_6H_{12}O_6$)
	1,83 — 1,35	—x—x—	= Na Cl
	1,90 — 1,50	—○—○—	= Ca Cl ₂
	2,15 — 1,65	—●—●—	= Al Cl ₃ · 6 H ₂ O
n/45 HCl	3,03 — 3,12	+-----+	= Glukose $C_6H_{12}O_6$
	3,20 — 3,50	—●—●—	= Ca Cl ₂
	3,18 — 3,40	—○—○—	= Na Cl.
		—△—△—	

12 Std Vorquellen, 12 Std Verdauen von je 250 mg denaturiertem Fischeiweiß in n/15 bzw. n/45 HCl. Normalität der Zufügungen bezogen auf Gesamtlöslichkeit pro Kölbchen. Sie ist logarithmisch aufgetragen.

5f. Verhalten gegenüber Abbauprodukten.

Diese scheinen deutlich hemmend zu wirken, was sich vor allem in dem Zurückgehen der Umsätze nach einer gewissen Zeit in den optimalen p_H -Bereichen bemerkbar macht. Ein Befund, auf den auch schon NORTHROP vor beinahe 30 Jahren hinwies.

5g. Einfluß von Elektrolyten und Nichtelektrolyten.

Um einer Deutung der im Abschnitt 5h geschilderten Phänomene näher zu kommen, wurde die Einwirkung von Elektrolyten und Nicht-

elektrolyten geprüft. Das Ergebnis wird aus Abb. 14 ersichtlich. (Es wurden selbstverständlich nur äquivalente Salzlösungen verglichen.) Bei einem Vergleich der Hemmung in verschiedenem p_H -Bereich fällt auf, daß dieselbe für Salze wesentlich geringer im Kathepsinbereich ist. Dies stimmt überein mit Befunden FREUDENBERGS für NaCl. Tab. 6 zeigt die Verhältnisse für Kochsalz.

Tabelle 6.

p_H 1,83 — 1,35	NaCl-Lösung	p_H 3,40 — 3,18
100 %	—	100%
94 %	0,01 n	100%
86,5%	0,02 n	100%
92,5%	0,042 n	105%
84 %	0,085 n	100%
73 %	0,165 n	92%
66,5%	0,44 n	70%
64,5%	0,9 n	53%
23 %	1,25 n	33%
23 %	1,75 n	37%
13 %	4,25 n	26%

Hemmende Wirkung steigender Mengen NaCl (ausgedrückt in Normalität pro Gesamtflüssigkeit je Kölbchen), prozentuale Umsätze bezogen auf einen entsprechenden Ansatz im gleichen p_H -Bereich ohne NaCl-Zugabe (Lösungen 9 cm³ HCl, 1 cm³ Magensaft, 12 Std Quellen, 12 Std Verdauen).

Stets ist die Hemmung im sauren Bereiche von etwa p_H 1,6 beträchtlich stärker als um p_H 3,25 (eine Ausnahme macht nur der Wert für 0,9 n HCl). Unterschiedliches Verhalten zeigen auch die ionisierten und nicht-ionisierten Zusätze in beiden p_H -Bereichen. In der Gegend der Kathepsin-wirksamkeit hemmt praktisch die undissoziierte Glukose in gleichem Ausmaße wie das zweiwertige CaCl₂ und diese beiden in höheren Konzentrationen etwas geringer als NaCl. Ganz anders sind hingegen die Verhältnisse im Bereiche des *Pepsin*optimums. Hier ist die undissoziierte Glucose nahezu ohne Einfluß auf die Verdauung, selbst bei 3facher Molarität und dem Konzentrationsverhältnis 10 : 1 zum Substrat; der geringe Abfall ist hier lediglich der entquellenden Wirkung dieser stark hypertonischen Lösung zuzuschreiben (die Zugabe des Zuckers und aller Salze erfolgte stets erst nach einer 12stündigen Quellung ohne dieselben).

Die 3 geprüften Salze, welche alle als Anion Cl enthalten und ein-, zwei- und dreiwertig sind, zeigen beim Vergleich äquivalenter Mengen ein sehr ähnliches Verhalten. Mit steigender Konzentration steigt auch die Hemmung, jedoch nicht proportional. Da es sich stets um die gleichen Anionen handelt, so sind für die verschieden starken Hemmungen der einzelnen Salze die Kationen verantwortlich zu machen. Diese Differenzen sind zwar nicht sehr groß, lassen sich aber relativ gut mit der

HOFMEISTERSchen Kationenreihe in Einklang bringen. Die dreiwertigen Al-Ionen und die zweiwertigen Ca-Ionen ziehen das Chlorion stärker an als die einwertigen Natriumionen, welche eine geringere Ladung besitzen. So werden die Chlorionen des einwertigen Natriums leichter an die positiv geladenen Proteingruppen herangelangen können, um Salze zu bilden.

Nach HOFMEISTER und FREY-WYSSLING haben die zwei- und dreiwertigen Aluminium- und Calciumionen ein größeres Atom und weisen daher eine geringere Hydratation und somit stärkere Affinität zu den Chlorionen als das einwertige Natrium auf.

Daß die Glucose ohne Einfluß ist, läßt sich mit diesen Anschauungen in Einklang bringen. Der Einfluß der Neutralsalze auf die Säuredissoziation war, da die Zufügung der Mengen im Bereich optimaler Umsätze erfolgte, zu vernachlässigen.

5h. Einfluß verschiedener Säuren.

Die Löslichkeit in saurem Milieu ist bei nicht denaturierten Substraten eine um vieles größere als bei denaturierten, daher wurden nur denaturierte Proteine verwendet. Auch hier schwankt die Löslichkeit mit dem Substrat und ist bei den organischen Säuren im allgemeinen höher als bei den anorganischen.

In seinen klassischen Enzymstudien sagt S. P. L. SOERENSEN abschließend unter anderem: „Zwischen Säuregrad und Wasserstoffionenkonzentration ist scharf zu unterscheiden, nur die letztere spielt bei enzymatischen Spaltungen eine Rolle.“ (Biochem. Z. **21**, 1909).

Auch die Befunde von L. MICHAELIS, der Versuche mit Oxal-, Wein-, Salpeter- und Salzsäure anstellte, die eine Abhängigkeit nur von der H^+ -Konzentration erkennen lassen, sind identisch mit SOERENSENS Ergebnissen.

Es schien also gleichgültig, welche Säure bei den Versuchen Verwendung fand, wenn man nur für das p_H Sorge trug. Daher fand ursprünglich HCl $n/2$, $n/10$, $n/15$ bis zu p_H 2,3—2,5 und von hier an Essigsäure bis in die Bereiche von etwa p_H 4,0, in denen dann Acetatpuffer bis p_H 6,5 folgten, Verwendung. An der Stelle des ersten Essigsäurewertes ($2n$) fand sich bei jeder Versuchsanordnung eine ausgesprochene Depression gegenüber dem letzten Salzsäurewert. Fand nun aber jedesmal nur ein und dieselbe Säure in allen p_H -Bereichen Verwendung, so war diese Zweigipfligkeit, die zunächst als Gipfel der Pepsin- und Kathepsinaktivität gedeutet wurde, nie zu beobachten. Auch ließ sich die Zweigipfligkeit je nach der verwendeten Säurekombination beliebig zwischen p_H 1,75 und 2,60 hin- und herschieben.

Es ergab sich bei der Aufnahme von p_H -Aktivitätskurven verschiedener Säuren, die jedesmal durch die ganze Reihe identisch waren, unter sonst

gleichen Bedingungen folgendes: Die sowohl absolut höchsten, als auch die sich über den größten pH -Bereich erstreckenden Umsätze wurden nahezu ausnahmslos mit Salzsäure erhalten. Annähernd gleiche Resultate ergab die Phosphorsäure. Bereits bei diesen beiden fällt auf, daß das Verhältnis der Umsatzgröße zwischen Salz- und Phosphorsäure bei gleichem pH mit steigendem Säuregrad sich immer mehr, aber keineswegs gleichmäßig, sondern recht plötzlich ansteigend zugunsten der HCl ver-

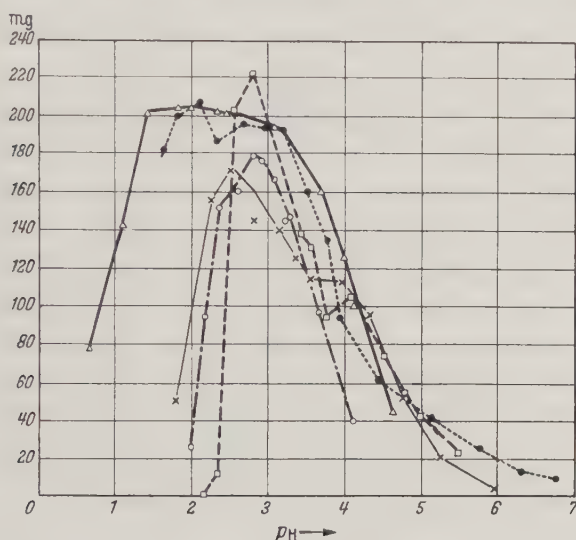


Abb. 15. 12 Std Vorquellen, 48 Std Verdauen von je 250 mg Rindskollagen,

- = Salzsäurelösungen,
- -○- - = Milchsäurelösungen,
- ...○... = Essigsäurelösungen,
- · - · - = Phosphorsäurelösungen,
- x— = Zitronensäure und Zitronensäurepuffer (anderer Magensaft und nur 40 Std verdaut).

schiebt. Bei Milch- und Essigsäure sind diese Befunde noch deutlicher ausgeprägt, ebenso bei der Zitronensäure. Sie stehen in keinem Verhältnis zu den an sich oft beobachteten niedrigeren Gesamtumsätzen bei Essig- und Milchsäure. Dies mögen Abb. 4 u. 6 veranschaulichen. Die Umsätze werden mit Essigsäure bei etwa pH 2,3 gleich null. An einer Stelle, wo sich ein Optimum der Pepsinverdauung finden sollte! Daß das gleiche Verhalten auch für andere Substrate zutrifft, zeigt Abb. 15.

Auch die Abb. 2, 3, 4, 5, 6, 10 usw. geben ein analoges Bild. Diese Befunde widersprechen denen der oben zitierten Autoren, was besonders deutlich auch in den Abb. 3, 10 und 16 wird. An der Richtigkeit der Befunde kann bei der Vielzahl der Versuche, der Vielfalt der Substrate und der Genauigkeit der Methode kein Zweifel sein. Ähnliche Ergebnisse

in der Literatur wurden lange nicht gefunden. Erst während der Reinschrift der vorliegenden Arbeit fand sich ein Aufsatz von NORTHROP aus dem Jahre 1919, in welchem dieser den Einfluß von Säuren auf die Proteinverdauung untersucht. Diese Arbeit erfaßt nur pH -Bereiche von 2,3 und 2,6. NORTHROP fand bei Verwendung verschiedener Proteine (die Werte für die Essigsäure stets pH 2,6) folgendes: „The rate of hydrolysis of all the proteins studied is identical for all the acids, except acetic. With gelatine acetic acid also behaves quantitatively like the other acids . . . , with the other proteins the rate of hydrolysis in the presence of acetic

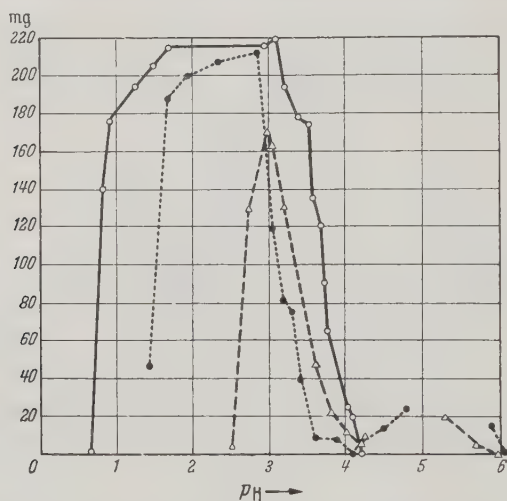


Abb. 16. 12 Std Vorquellen, 24 Std Verdauen von je 250 mg denaturiertem Hühnermuskeleiweiß

— = Salzsäurelösungen,
 - - - = Essigsäurelösungen,
 . . . = Phosphorsäurelösungen.

acid is slower than with HCl , HNO_3 , H_2SO_4 , oxalic, citric or phosphoric acid. The effect therefore is evidently on the protein and not on the enzyme.“

Eine weitere Erhellung dieser Tatsache bringt er aber nicht. Da er gerade bei einem pH untersucht, in dem bei der hier gebrauchten Versuchsanordnung bei der Mehrzahl der Substrate, deren Charakter ebenfalls von Bedeutung ist, die Hemmung erst beginnt, und wirklich deutlich erst bei einer Konzentration von 0,5 n an, also etwa pH 2,5 wird, so ließe sich hieraus das abweichende Verhalten der Gelatine erklären. Es wird hier deutlich, daß hohe Säurekonzentrationen (mehr als 0,5 n, ausnahmsweise auch erst einmal 2 n in Abhängigkeit vom Substrat) die Umsätze ausgesprochen hemmen und etwa gleich null werden lassen, dies bei einer

aktuellen H-Ionenkonzentration, bei der andere, niedriger konzentrierte Säuren das überhaupt mögliche Optimum der Verdauung aufweisen. Die Umsätze sind null oder nahezu null bei 4 n Essigsäure, 2 n Milchsäure, 3 n Citronensäure, 2 n Salzsäure. Die Dissoziationskonstanten dieser Säuren sind:

für HCl praktisch unendlich

H_3PO_4	$1,1 \cdot 10^{-2}$
Citronensäure	$8,4 \cdot 10^{-4}$
Milchsäure	$1,38 \cdot 10^{-4}$
Essigsäure	$1,75 \cdot 10^{-5}$

Je kleiner die Dissoziationskonstante, desto mehr verschieben sich die hohen Umsätze gegen das alkalische Gebiet hin.

Eine Erklärung dieses eigenartigen Phänomens läßt sich etwa folgendermaßen geben. Nach den Arbeiten von MICHAELIS und SOERENSEN faßt man das eiweißverdauende Ferment des Magens als Elektrolyt auf, der nach dem Massenwirkungsgesetz dissoziiert und dessen Zustand genau von der Wasserstoffionenkonzentration geregelt wird. Im Gegensatz zu den alten Befunden von MICHAELIS fanden TISELIUS, HENSCHEN und SVENSSON, daß Pepsin eine homogene Proteinkomponente sei, die im Bereiche von p_H 4,57 bis 1,08 keinen I.E.P. zeigt und mit einer negativen Ladung, also anodisch wandert. Es ergeben sich somit folgende reagierende Komponenten: Das Magenproteaseanion verbindet sich mit dem Eiweißkation (entsprechend der positiven Ladung von Eiweißkörpern in sauren Medien). Dieser Mechanismus wird nicht nur für molekular-disperse Lösungen Gültigkeit haben, sondern auch für feste Substrate, wenn man an Stelle der Dissoziation die Ladung des Substrates setzt, und die an der Oberfläche der Proteinteilchen ablaufende Reaktion als Ionenaustauschadsorption auffaßt. Daß festes Substrat die Magenfermente selektiv adsorbiert, wurde bereits früher gezeigt (Abb. 7). Nun tritt aber als Konkurrent des Magenproteaseanions dasjenige der in der Lösung befindlichen Säure hervor, und es wird sich ein Gleichgewicht einstellen, welches bei überwiegender Konzentration der Säure sehr zu Ungunsten der Magenprotease ausfallen muß, wobei für schwach dissoziierende Säuren noch hinzukommt, daß ihre Eiweißsalze in ebenfalls schlecht dissoziiertem Zustande vorliegen und so blockiert sind gegenüber den Magenproteaseanionen. Hierfür ist Abb. 11 ein ganz besonders deutliches Beispiel. Während die Salzsäure dem Pepsin bei p_H 1,5 eine optimale Wirkung erlaubt, nähern sich die Umsätze in der gleichen Versuchsanordnung jedoch mit Citronensäure schon bei p_H 1,75 rapide dem Nullwert. Man ersieht aus der Abbildung weiter, daß diese Verhältnisse weder durch Änderungen des Zeitfaktors noch durch solche der Ferment- und Substratkonzentration in qualitativer Hinsicht beeinflusst werden, *solange die Säurekonzentration konstant bleibt*. Dies erklärt auch

die Hemmung durch das Salzanion Cl^- in Abschnitt 5g. — Es ist möglich, diese Erklärung auch anzuwenden für die Abweichung, die MICHAELIS von seiner theoretisch berechneten Pepsindissoziationskurve (mit HCl

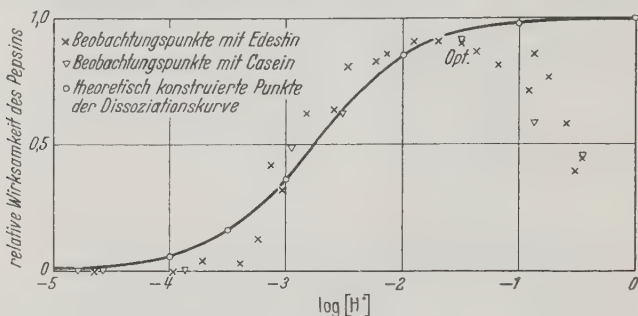


Abb. 17. Abszisse: $\log H_+$, Ordinate: relative Wirksamkeit des Pepsins.
(nach L. MICHAELIS u. A. MENDELSSON, Bio. Z. 65 (1914).

aufgestellt) erhielt (Abb. 17), da für HCl in hohen Konzentrationen die oben geschilderten Verhältnisse ebenfalls zutreffen, wie Abb. 16 zeigt. Die Erklärung von MICHAELIS, der einen Abfall des Umsatzes jenseits $p_H 1,5$

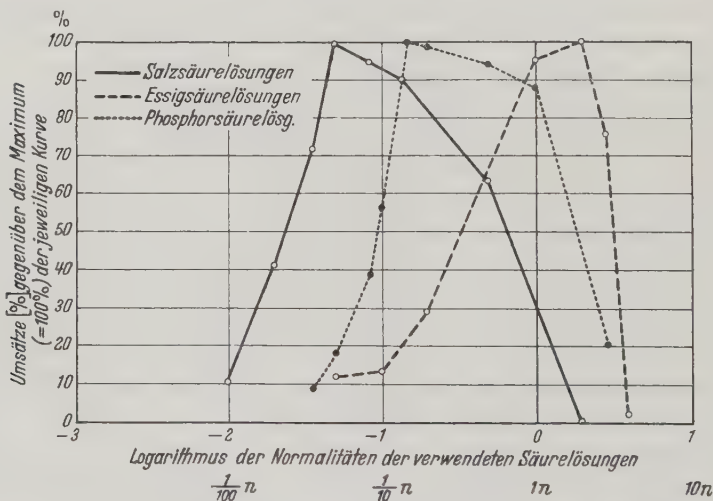


Abb. 18. Grundkurve ist Abb. 16.

als eine Zerstörung des Pepsins durch Säure einerseits und den Übergang des einwertigen in ein zweiwertiges Pepsinkation andererseits deutete, dürfte kaum aufrechtzuerhalten sein, da nach TISELIUS Pepsin immer als Anion vorliegt; und zudem viele Autoren (u. a. BUCHS) Pepsin mit 2 n HCl behandelten, ohne in nachfolgenden Versuchen je eine Schädigung durch diese hochkonzentrierte Säure festzustellen. Zeichnet man die Um-

sätze von Abb. 16 nicht in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration, sondern von der Normalität der angewandten Säuren, so sieht man, daß, um maximale Umsätze zu erzielen, die Essigsäure um beinahe zwei Zehnerpotenzen stärker konzentriert sein muß als die Salzsäure (Abb. 18). Demzufolge müssen p_H -bedingtes Umsatzmaximum und konzentrationsbedingtes Hemmungsmaximum bei der Essigsäure viel dichter beieinander liegen als bei den stark dissoziierten anorganischen Säuren. Die Punkte maximaler Hemmung liegen unabhängig von Dissoziationskonstante und p_H bei etwa gleichen Säurekonzentrationen. *Es ist also der Einfluß einer Säure nicht ausschließlich in der aktuellen H-Ionenkonzentration zu suchen.*

Der von NORTHROP zitierte Satz ist dahin abzuwandeln, daß der Effekt nicht allein abhängig ist vom verwendeten Protein, sondern in gleichem Maße von der benutzten Säure. — Im katheptischen Schenkel der Kurve herrschen diese Regelmäßigkeiten nicht vor. Alle Umsätze pflegen denen mit Salzsäure parallel zu laufen, wenn auch die Umsätze der Essigsäure sehr oft, aber in Abhängigkeit vom Substrat beträchtlich niedriger sind als die der Salzsäure, was sich mit der schlechten Dissoziation des Essigsäurealbuminates erklären läßt.

Es ist möglich, so auch eine „Zweckmäßigkeit“ darin zu sehen, daß der Organismus eine so starke Säure wie $n/10$ HCl absondert. Er kann wegen des starken Dissoziationsgrades derselben mit einem relativ kleinen Quantum auskommen.

6. Besprechung der Ergebnisse.

Folgende für die physiologische Eiweißverdauung des Magens wichtigen Vorgänge wurden, wie das bei in vitro-Versuchen kaum zu umgehen ist, nicht berücksichtigt:

1. Die Motorik in ihrer verschiedenen endogenen und exogenen Bedingtheit, der leicht zu wenig Beachtung geschenkt wird.

2. Erhielt man stets nur Magensaft, der in der zweiten Sekretionsphase produziert wurde; die erste, psychische, die besonders reich ist an Magenfermenten, fand keine Berücksichtigung. Aber auch in der zweiten Phase sind Art und Menge der zugeführten Nahrung von großer Bedeutung (PAWLOW, FREUDENBERG). Besser als viele Worte erläutert dies folgende Tab. 7:

Tabelle 7.

	Gesamtsekretion	Säurekonzentr.	Fermentkonzentr.
Fleisch	hoch	hoch	mittel
Brot	mittel	niedrig	hoch
Milch	niedrig	mittel	niedrig

(Zitiert aus: BEST and TAYLOR: Physiol. Basis . . . 1944 nach PAWLOW modif. von CARLSON.)

Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, daß sicher immer ein recht ferment-reicher Magensaft mit dem Probefrühstück gewonnen wurde. Die dritte, intestinale Phase der Sekretion blieb ebenfalls unberücksichtigt.

Unter Beachtung dieser Verhältnisse seien die Resultate vorliegender Arbeit besprochen.

Bei Zugrundelegung der klassischen p_H -Aktivitätskurven und nach Definition aller älteren Autoren liegt das Umsatzoptimum des Pepsins je nach Substrat zwischen p_H 1,5 und 2,0. Die hier mitgeteilten Kurven zeigen aber in Übereinstimmung mit den Kathepsinforschungen von FREUDENBERG und BUCHS, daß bei diesen H^+ -Konzentrationen ein Optimum manchmal noch nicht erreicht ist und fast immer ist die Höhe der Umsätze, die zwischen p_H 1,5—2,0 (Pepsin) erzielt wird, in weit alkalischeren Bereichen (p_H 3,0—4,0 Kathepsin) die gleiche, ja zuweilen sogar eine höhere. Für die meisten Proteine lassen sich Umsätze von mehr als 25% des Optimums bei p_H 4,5 nachweisen und für das Haupteiweiß der Milch beträgt der Umsatz bei 5,00 noch etwa 80% des absoluten Optimums. Dies ist freilich eine besonders gute Anpassung des Substrates an die dort wirkende Fermentkomponente und ist, um die Eiweißbilanz des Säuglings zu sichern, unerlässlich.

Von Bedeutung scheint für Erbsen, Hafer, Soja, Fisch-, Rind-, Huhn-muskel, Leber und Paracasein die Tätigkeit einer Protease zwischen 4,25 und 5,5, bei der es sich möglicherweise um das von HAMMARSTEN erwähnte Parachymosin handelt, oder auch weniger wahrscheinlich um ein Kathepsin. Die Umsätze in diesen Bereichen betrugen 20% und mehr der Optima. — Bei dem Bestreben, eine spezifische Charakterisierung des Kathepsinanteiles zu geben, erwies sich die Verdauung bei einer Temperatur von 73° C als erfolgreich. Eine deutliche Aktivierung des katheptischen Anteiles bei p_H 2,75—3,0 ist gegenüber einer ebenso deutlichen Hemmung im peptischen Bereiche zwischen 1,5 und 2,0 festzustellen.

H_2S und Cysteinchlorid blieben ohne Einfluß, bis auf einen Fall, in dem es gelang, zwischen p_H 3,0 und 5,0 einen schwach wirkenden Magensaft auf die übliche Fermentaktivität der anderen Magensäfte mittels Cysteinchlorid zu bringen.

Blausäure zeigte einen durchwegs stark hemmenden Effekt, was für eine von den Sulfhydrylgruppen verschiedenen Wirkungsmechanismus spricht.

Ascaridenextrakte wirken hemmend in allen p_H -Bereichen. — Auch während der normalen Verdauung treten in den Bereichen des optimalen Umsatzes Hemmungskörper auf.

Es gelang bei Verwendung einheitlicher Säurelösungen niemals, eine Zweigipfligkeit festzustellen. Vielmehr gehen peptische und katheptische Wirkung fließend ineinander über, was für die Einheitlichkeit der Magenprotease spricht.

Von größter Bedeutung ist auch die Natur des Substrates, von dem Optimum und Höhe des Umsatzes in der Zeiteinheit mitbedingt sind. Nach der Angreifbarkeit der Proteine kann die Reihe aufgestellt werden: Fibrin, Muskeleiweiß, Eialbumin, Kollagen, Paracasein. Die relativ schlechte Angreifbarkeit des Paracaseins gilt unter den gewählten Experimentalbedingungen (Unlöslichhaltung durch Ca-Überschuß). *Tierisches Eiweiß wird viel schneller verdaut als pflanzliches*. Dies sollte bei gleichen Befunden im Dünndarm bei der Beurteilung der „biologischen Wertigkeit“ eines Eiweißes nicht vergessen werden.

Es lassen sich grob 4 Haupttypen der Eiweißverdauung unterscheiden:

1. Plateauartiger Verdauungsverlauf, wie beim Paracasein (p_H -Optimum zwischen 1,5 und 4,5), Abfall bis p_H 6 sich erstreckend.

2. Maximum bei 1,5, neues Maximum aber kleiner zwischen 4,5 und 5,5, dazwischen langsames Absinken wie beim Erbseneiweiß. Ob es sich bei dem zweiten Gipfel nur um eine Desaggregation handelt, ist mit der angewandten Methode nicht festzustellen.

3. Symmetrische Kurve (z. B. Fibrin). Optimum zwischen 1,5 und 3,5, langsames Abfallen nach beiden Seiten (entspricht der NORTHROPschen Gelatinekurve).

4. Eialbumin als Beispiel. Hohe Umsätze über 2 p_H -Bereiche 1,15—3,25, nach beiden Seiten steiler Abfall, bei p_H 4,0 Umsatz gleich null. In weiter alkalischen Bereiche kein erneutes Ansteigen der Verdauung. — Vor allem in alkalischer Richtung variiert der Kurvenverlauf also stark. Das Optimum durch die katheptische und eventuell Chymosinwirkung ist, wie ersichtlich, sehr substratabhängig und variiert mit demselben.

Ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen I.E.P. und katheptischem Anteil der Magenprotease läßt sich nirgends feststellen, die Optima liegen in fast allen Fällen erheblich weiter im sauren Gebiet.

Man kann sich vorstellen, daß nicht nur ein I.E.P., sondern auch eine isoelektrische Zone existiert, nach der sauren Seite hin besteht sie aus einem Gemenge von isoelektrischem und kationischem Eiweiß. Das Kathepsin wirkt in der Zone zwischen I.E.P. und völliger Überführung des Proteins in die kationische Zustandsform. Auch das Kathepsin greift nicht rein isoelektrisches Eiweiß an, seine Wirksamkeit erstreckt sich nie über den I.E.P. in schwächere Säuregrade. Wenn Umsätze auch in diesem Gebiet vorhanden sind, so lassen sie sich auf andere Weise erklären. Sie zeigen sich bei folgenden Substraten:

Parmesan	(Abb. 2)	Lebereiweiß	(Abb. 4)
Paracasein	(Abb. 2, 7 u. 11)	Erbseneiweiß	(Abb. 3)
Rindskollagen	(Abb. 11 u. 15)	Sojaeiweiß	(Abb. 5)
Hühner-, Fisch- und		Hafereiweiß	(Abb. 5)
Rindermuskeleiweiß	(Abb. 3, 10 u. 16)		

Außer beim Erbseneiweiß sind die Wirkungen bei p_H 4—6 schwach und reichen nicht an die des Pepsins und Kathepsins heran. Wir führen sie, wie oben erwähnt, mit HAMMARSTEN auf Parachymosin-Wirkung zurück. Daß hier eine besondere Enzymkomponente eine Rolle spielt, ergibt sich auch daraus, daß die Kurven unter Umständen bis zur Abscisse abfallen, um sich dann zu einem kleineren Nebengipfel zu erheben.

In Bereichen, die saurer als p_H 2,5 sind, verhalten sich die Proteine qualitativ weitgehend gleich. Das Optimum liegt hier zwischen 1,25 und 1,8.

Für Paracasein und sein Derivat, den Parmesankäse, ergab sich der sehr interessante Befund, daß Paracasein keineswegs als unlösliches Calciumsalz ausflockt, vielmehr nur in der isoelektrischen Zone und saurer als p_H 1,5 unlöslich ist. Ein Überschuß an $CaCl_2$ vermag die Lösung zu verhüten oder ein in Lösung befindliches Paracasein wieder 100% ig auszuflocken. Das an das Paracasein selbst gebundene Ca genügt nicht.

Ein Beweis für die Identität des labenden und verdauenden Anteils ist der Versuch, in dem vermittelt reinen Kälberlabes Paracasein ausgeflockt wurde, das man dann in aufsteigenden p_H -Reihen sich selbst überließ. Es resultierte eine Umsatzkurve, die qualitativ absolut identisch ist mit einer solchen, bei der Magenferment vom Menschen in der üblichen Konzentration zugesetzt wurde.

Je länger die Verdauung, desto größer ist die Verschiebung in alkalische und saure Bereiche und das Sinken in den ursprünglich optimalen mittleren Bezirken; die Hauptwirkung des katheptischen Anteils macht sich erst nach vielen Stunden bemerkbar.

Die Umsatzsteigerungen verhalten sich der Quadratwurzel der Fermentkonzentrationen etwa proportional (SCHÜTZSCHE Regel). Dies stimmt überein mit den anderen kinetischen Versuchen, die nicht oder nur in grober Annäherung das Verhalten einer idealen monomolekularen Reaktion zeigen.

Elektrolyte (Salze) zeigen wie Nichtelektrolyte ein stark p_H -abhängiges Verhalten, welches für Salze bei p_H 1,6—1,8 etwa dem der HOFMEISTERSCHE Ionenreihe entspricht. Bei p_H 3,25 hingegen ist die Hemmung durch alle Substanzen in schwächeren Konzentrationen gleich. Auch Glucose, die im peptischen Bereich keinen Effekt hat, verhält sich hier gleich wie die Salze. In höheren Konzentrationen hemmt NaCl etwas stärker als die anderen Salze, aber ganz wesentlich schwächer als im Bereich des Pepsins.

Folgende Resultate ergab die Untersuchung verschiedener Säuren: Daß denaturierte feste Eiweiße weniger als native der Säurelösung, die mit steigenden p_H zunimmt und je nach Art der Säure verschieden ist, anheimfallen, ist weniger erstaunlich, als die direkte Abhängigkeit der Umsatzgrößen von der Dissoziationskonstante der verwendeten Säuren.

Schwach dissoziierte Säuren hemmen die Verdauung völlig oder nahezu völlig bei einer H^+ -Konzentration, bei der optimale Pepsinwirkung im HCl-Medium besteht. Je kleiner die Dissoziationskonstante der betreffenden Säure, desto früher tritt die Hemmung auf (d. h. in desto weniger sauren Bezirken). Diese Hemmung wird gedeutet als Blockierung des Eiweißkations durch das Säureanion (bei den Salzversuchen gilt für das Salzanion analoges), welches letzteres durch die zur Erzielung einer großen H^+ -Konzentration in großer Menge vorliegenden schwachen organischen Säuren potentiell reichlich vorhanden ist; als zweiter Faktor wird die geringe Dissoziation dieser Salze von schwachen Säuren und Basen betrachtet. Das Fermentanion kann also unter solchen Bedingungen an dem Proteinkation nicht zur Wirkung kommen. Auch für die stark dissoziierte HCl gilt dieses Verhalten bei Konzentrationen, die 0,5 n überschreiten. Es tritt plötzlich eine abrupte Hemmung der Umsätze auf. Dieselbe ist nicht als Schädigung der Fermente durch die konzentrierte Säure anzusehen, viele Autoren extrahierten und behandelten Pepsin mit starken anorganischen Säuren ohne den geringsten Wirkungsverlust zu beobachten.

Sollten sich aus den mitgeteilten Resultaten therapeutische Konsequenzen ergeben, so sind es wohl die, bei Achylien, wie schon FREUDENBERG empfahl, eine organische Säure zu verwenden, und zwar eine solche, wie aus den hier mitgeteilten Befunden erhellt, die eine mittlere Dissoziationskonstante und hohe potentielle H^+ -Konzentration besitzt, also etwa Citronensäure. Von EICHHOLTZ wird aus anderen Erwägungen heraus zur Therapie der achylischen Chloranämien ebenfalls Citronensäure empfohlen; oder aber es wäre zu einer Substitutionstherapie mit Proteinase von Pilzen oder der höheren Pflanzen zu raten, die ein anderes pH -Wirkungsspektrum besitzen als die des menschlichen Magens. — Weiter scheint es nicht ratsam, stark gesalzene Proteine zu sich zu nehmen, besonders wenn Achylie besteht.

Zusammenfassung.

Es wurde die verdauende Kraft menschlichen Magensaftes auf feste Eiweißkörper untersucht. Die Resultate sind folgende:

1. Der pH -Wirkungsbereich ist im schwach sauren Gebiet stark substratabhängig. Das Kathepsinoptimum schwankt mit dem Substrat zwischen 3,0—4,0. Eine Zweigipfligkeit zwischen 0,5—4,5 war nie zu beobachten.

2. Mit Zunahme der Verdauungszeit hat das Kathepsin größere Wirkungsmöglichkeiten. Zu Beginn ist sein Effekt geringer. Im stark sauren Gebiet gilt für das Pepsin ähnliches. Das Optimum des Umsatzes, welches aus einer Kombination der Kathepsin- und Pepsinwirkung besteht, liegt meistens zwischen 1,5 und 3,3.

3. Hitzeaktivierung ($73^\circ C$) führt zur Steigerung des Kathepsin- und zur Hemmung des Pepsinumsatzes. Das Proteolysenoptimum liegt dann etwa bei pH 2,8.

4. Aktivierung durch H_2S gelang nie. Cysteinchlorid aktivierte in einem Falle einen Magensaft von schwacher Wirkung im Bereiche von p_H 3,0—5,0, jedoch war die erzielte Aktivität keine größere als bei einem optimalen unbehandelten Magensaft.

5. Blausäure wirkte unter den hier geübten Versuchsbedingungen ausgesprochen hemmend auf beide Anteile der Magenprotease; daraus wird geschlossen, daß Blausäure- und Sulfhydrylmechanismus verschiedener Natur sein müssen.

Ebenso hemmend verhalten sich Ascaridenextrakte. Im peptischen und katheptischen Bereich entstehen während der Verdauung in gleichem Umfang Hemmungskörper.

6. Einige Proteine zeigen zwischen p_H 4,5 und 5,5 Umsatzanstieg auf etwa 20% des Optimums. Es wird eine Parachymosinwirkung (HAMMARSTEN) der einheitlichen Magenprotease in Abhängigkeit von Reaktionsmedium und Substrat erwogen.

7. Elektrolyte und Nichtelektrolyte zeigen dem peptischen und katheptischen Anteil gegenüber verschiedenes Verhalten. Im Pepsinbereich hemmen Elektrolyte (hier: Anion des Salzes), entsprechend der HOFMEISTERSCHEN Ionenreihe, im Kathepsinbereich ist die Hemmung allgemein schwächer, hier hemmen auch Nichtelektrolyte, jedoch unbedeutend.

8. Das Sinken der Umsätze im sauren Bereich hängt von der Dissoziationskonstante der angewandten Säure ab. Eine Hemmung beginnt etwa bei 0,5 n—1 n Säurekonzentration, unabhängig von der H^+ -Konzentration. Diese Hemmung wird zurückgeführt auf eine Blockierung des Substratkations — gegenüber dem Fermentanion — durch das Säureanion.

9. Die Umsätze mit Essigsäure sind im allgemeinen in allen p_H -Bereichen niedriger als die mit anderen Säuren.

10. Paracasein ist in allen p_H -Bereichen außer in der isoelektrischen Zone und unterhalb p_H 1,5 löslich. Dieses Protein ist besonders gut an die Erfordernisse der Hydrolyse im Säuglingsmagen angepaßt. Da sich die verdauende Wirkung des Magensaftes auf dieses Substrat bis gegen p_H 6 erstreckt, ist eine Mitwirkung des Parachymosins wahrscheinlich.

11. Es wird ein Beweis für die Identität des labenden und verdauenden Vorganges sowie für die Einheitlichkeit der Magenprotease erbracht.

12. Die pflanzlichen Eiweiße werden durchwegs langsamer als die tierischen angegriffen, auch ist die Kathepsinwirkung bei ersteren weniger stark.

Literatur.

- ABELIN, I.: Einführung i. d. experimentelle chem. Physiologie, Bern 1944. — ANSON, M. L.: J. Gen. Phys. 20, 565 (1936). — BAMANN-MYRBÄCK: Methoden Fermentforschung I u. II, Leipzig 1941. — BERGMANN, M.: Advances Enzym.

N. Y. 1942 vol. II. — BEST and TAYLOR: *Physiol. Basis of Med.* Baltimore 1944. — BLADERGROEN, W.: *Physikal. Chem. i. Med.* . . 2. Aufl. Basel 1949. — BUCHS, S.: Über d. Katheps. d. Magensaftes, Diss. Basel 1940. — *Biologie d. Magenkathepsins* 1947. — *Enzymologia* **13**, 4 (1949). — COHNHEIM, O.: *Chemie der Eiweißkörper* 1911. — v. DAM, W.: *Z. phys. Chem.* **79**, 247 (1912). — EICHHOLTZ, E.: *Lehrbuch der Pharmakologie*, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1948. — FREUDENBERG, E.: *Physiologie u. Pathologie d. Verdauung im Säuglingsalter*, Berlin 1929. — FREUDENBERG, E., u. S. BUCHS: *Schweiz. med. Wschr.* **1940**, No. 12. — FREUDENBERG, E.: *Schweiz. med. Wschr.* **1945**, 735. — *Enzymologia* **8**, 6. — *Annales Paed.* **166**, 77 (1946). — *Handbuch d. biol. Arbeitsm.* ABDERHALDEN Abtl. I, Teil 8, 1922. — *Handbuch d. biochem. Arbeitsm.* ABDERHALDEN Abtl. III, 1910. — *Handbuch d. Milchwirtschaft II₂*, Wien 1931. — *Handbuch d. Lebensmittelchemie*, Berlin 1936. — *Handbook of chemist. and phys.* HODGMAN 1946. — HAMMARSTEN, O.: *Z. physiol. Chemie* **102** (1918). — HOPPE-SEYLER-THERFELDER, Berlin 1924. — JASSINOWSKI, M. A.: *Frankf. Z. f. Pathol.* **32**, 239. — LANG u. WEGNER: *Biochem. Z.* **318**, 462 (1948). — LEHNARTZ, E.: *Lehrb. d. chem. Physiol.* Berlin 1943. — MICHAELIS, L.: *Biochem. Z.* **60** (1914). — MICHAELIS, L., u. P. RONA: *Biochem. Z.* **97** (1919). — MICHAELIS, L.: *DMW* 1918 No. 25. — MICHAELIS, L., u. A. MENDELSSOHN: *Biochem. Z.* **65** (1914). — MERTEN, R., u. H. RATZER: *Klin. Wschr.* **1949**, 35/36; **1949**, 37/38. — NORTHROP, J.: *J. gen. Phys.* **I** 1919. — *Naturwissenschaften* **11**, 34 (1923). — PURR, A.: *Biochem. Z.* **320**, 74, (1949). — RONA, P.: *Prakt. d. Physiol. Chemie*, Berlin 1926. — SAHYUN, M.: *Amino-acids and proteins* N. Y. 1948. — SCHÄFFNER, A., u. M. TRUELLE: *Biochem. Z.* **315** (1943). — SOERENSEN, S. P. L.: *Biochem. Z.* **21**, 131 (1909). — STARLING: *Princ. of Hum. Phys.* London 1941. — SUMNER, J., u. F. SOMERS: *Chemistry and Methods of Enzymes* N. Y. 1947. — TISELIUS, A., HENSCHEN, SVENSSON: *Biochem. J.* **1814**, 1938. — WALDSCHMIDT-LEITZ, E.: *Die Enzyme*, Braunschweig 1926. — WILLSTÄTTER, R.: *Z. Physiol. Chemie* **180**. — WILLSTÄTTER, R. u. Mitarb. *Untersuchungen über Enzyme*, Berlin 1928. — WILLSTÄTTER, R., F. HAUROWITZ, u. F. MEMMEN: *Z. phys. Chem.* **140**, 203 (1924). — WILLSTÄTTER, R., u. W. GRASSMANN: *Z. phys. Chem.* **138**, 184 (1924). — WISS, O.: *Helv. Chim. Acta* **29**, 237 (1946).

